

TESIS DOCTORAL

**AVANCES EN EL TRATAMIENTO DEL
GLIOBLASTOMA
EMPLEANDO EL FÁRMACO RAPAMICINA**

Marina Mendiburu-Eliçabe

Madrid 2010

Memoria de investigación presentada por Marina Mendiburu-Eliçabe para optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid. Trabajo dirigido por la Dra. Marta Izquierdo Rojo, catedrática del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, por el Dr. Krystoff Bankiewicz,, catedrático de neurocirugía y neurología, por el Dr. Piotr Hadaczek, investigador asociado y por el Dr. John Forsayeth, catedrático adjunto del departamento de neurocirugía de la Universidad de California San Francisco (UCSF).

a Ignacio

Agradecimientos

Esta tesis doctoral no habría sido posible sin la ayuda de un gran número de personas que, a lo largo de los últimos años han contribuido de una u otra manera a hacerla posible.

A Krys, por haber confiado en mí desde el primer momento dándome la gran oportunidad de trabajar en su laboratorio y aceptando la dirección de esta tesis.

A Marta, por aceptar la codirección de esta tesis y por su entusiasmo científico.

A Piotr, por la gran paciencia con mi inglés, por haberme enseñado tanto y haber seguido de cerca mi trabajo.

A John Forsayeth, por todas las aportaciones y sugerencias en el desarrollo del trabajo y por las inolvidables historias a la hora de comer.

A Yuying, por haber trabajado codo a codo conmigo desde el primer momento; gran parte del trabajo de esta tesis es tan tuyo como mío. Gracias por compartir conmigo tus historias y tu cultura y, sobre todo, por ser más que una compañera una gran amiga.

A “las chicas” Hannna y María, por enseñarme tanto de inmunohistoquímica y por los buenos momentos que pasamos durante el “tea time”.

A Ernesto, aunque coincidimos poco tiempo, por hacer de transportista y por compartir conmigo experiencias en castellano, todo un desahogo.

Al resto de compañeros del laboratorio de UCSF que de una manera u otra me ayudasteis en el desarrollo de esta tesis, compartisteis vuestros conocimientos y buenos momentos: Dali, Janine, Adrian, Francisco Vallés, Francisco Giménez, Phil, John Bringas, Xiaomin, Nitasha y Michal.

A Russ Pieper, por haberme dado alguna de las ideas claves para el desarrollo de esta tesis.

A los compañeros del 202, a Sandra, por subirme a la moto para poner un poco de orden en el laboratorio y por tu ayuda con los western; a Willie, por tu increíble sentido del humor y tus historias, que hicieron que pasáramos momentos inolvidables; a Alejandro por mantener buen ánimo pese a cualquier circunstancia y por todos los mates que me cebaste.

A Jon, por tu gran generosidad, por todo lo que me has ayudado en el desarrollo de la tesis y por tu paciencia al aguantarme todo el día.

A los antiguos compañeros que padecieron mis primeros pasos en la investigación y de los que aprendí un montón, Vega, Ricardo, Nuria, Irene y Esteban.

A la gente que conocimos en los 2 años que estuvimos en San Francisco y sobretodo a Isa y Juan por haber compartido la experiencia casi desde el minuto cero y haber sido como nuestra familia durante ese tiempo.

A todos los amigos y familiares que quisieron compartir de cerca con nosotros la “experiencia americana” y volaron hasta Berkeley.

A los amigos, por aguantar las historias de mis ratas durante estos años y sobretodo por haber sido la vía de distracción, diversión y desahogo: Juancar, Yolanda, Raúl, Lauri, Gilda, Luis, Darío, Miguel, Ana, Bea, Sara, Ángela, Nacho, Fernando, Ana, Viti, Vera, Lara, Pau, Juan, María, y a mis compañeros de carrera y de trabajos.

A Nora Fernández y Raúl Moncayo, por la gran ayuda que me dieron escuchándome.

A la familia del otro lado del charco por seguir con cariño mis pasos: abuela Nana, Javier, Marcela, Laurita, Germán, Marina, Carmen, Fermín y en especial a mi abuelo Carlos, por haberme hecho, con 6 años, mirar por un microscopio y convencerme así de que me dedicase a la bioquímica.

A la familia Mendiburu, Cali, Pato, Tati, Mariano y Gonchi, por los asaditos, empanadas y reuniones familiares.

A mi familia adoptiva por todo el apoyo y cariño que me habéis brindado a lo largo de todos estos años: José Luis, Gloria, Amancio, Juanita, Glori, Carmen, Cali, Marisa, Inma, Ricardo, Rodolfo y Marina.

A Javier mil gracias por el álgebra, por el cálculo, por Galileo, por tus traducciones y correcciones de la tesis y por supuesto por tu amor.

A Rosa, por tu energía vital contagiosa y por todo el aprecio, cariño y comprensión que me has dado desde el primer momento en que te conocí.

A Pablo y Feli, por haber podido compartir con ustedes toda mi vida y estar de vuelta en un momento tan especial para mí.

A mis abuelos Carlitos y María Esther, por haber sido unos abuelos de libro, por haber tenido la gran suerte de poder crecer con ustedes. Gracias abuelo por contagiarme tu pasión por los libros y gracias abuela por tu vitalidad y fuerza capaz de mover montañas.

A Pasku, por tu amor y tus historias a los pies de la cama, que un día se convirtieron en historias científicas e hicieron que me entusiasmara soñando que quería curar el cáncer.

A mis hermanitos Martín, María y Carmen, que ya van creciendo y aguantan que les siga considerando chiquitos, mil gracias por todo el amor que me dan.

A Ana, mi hermana, gracias por darme la mano cuando me cagaba de miedo, por defenderme hasta en lo indefendible, por quererme más allá de lo posible, por todo el tiempo que estuvimos juntas y estaremos y aguantarme como hermana pequeña.

A mi madre, por tu forma de ver la vida, por haber confiado siempre en mí, mucho más de lo que yo soy capaz, y haber estado convencida de que sería investigadora desde que lo decidí de pequeña y haberme de esa manera, animado. Por haber respetado todas mis decisiones.

A mi padre, por empeñarte en que fuera feliz, por entenderme, escucharme y mostrarme lo importante que es luchar por un deseo.

Gracias a los dos, papi y mami, por todo el cariño y amor que siempre me hacen llegar allá dónde esté y que me hace sentir mucho mejor, yo también los quiero.

A mi bebé, que está en camino, por compartir conmigo, desde mi panza, los últimos meses de esta tesis llenando mi vida de ilusión y felicidad.

A Ignacio, por entenderme con sólo mirarme, por sostenerme, por ayudarme, por tus fines de semana y veranos, por animarme en mis lunes libreros, por tu paciencia, por tu optimismo inveterado, por llenar mi vida de felicidad, por que sin vos a mi lado esto hubiera sido imposible. Te amo.

Abstract

The principal aim of this study was to enhance rapamycin treatment efficacy in human glioblastoma multiforme, establishing a treatment capable to improve survival. To achieve this proposal we have evaluated the differences in survival and inhibition states of PI3K/Akt/mTOR pathway, when different concentrations and schedules of rapamycin or its analog torisel were used. We demonstrate, in the intracranial U87MG xenograft model, that the increase of the dose concentration do not imply a huge improve on survival. However, when stable levels of rapamycin were kept with intermittent treatment schedules, a significantly improved median survival was observed. No differences were found when the efficacy of rapamycin was compared to its analog torisel. The efficacy of intermittent treatment schedules was associated with prolonged inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway in tumors. The inhibition state of this pathway was studied analyzing the phosphorylation of the ribosomal protein S6. We have characterized the effect of rapamycin upon human glioblastoma cancer stem cells (CSCs). The drug was able to reduce cell proliferation, autoregeneration and the ability of colony formation in vitro; but the intracranial brain tumor xenograft CSCs model was resistant to rapamycin treatment. Combined therapy of rapamycin and nanoliposomal irinotecan (nLs-CPT-11) was used in the treatment of U87MG intracranial brain tumor model resulting in a 6-fold survival improvement in comparison to control animals. We conclude that CED of nLs-CPT-11 and systemic rapamycin may be an effective treatment option for malignant gliomas.

Índice

Abreviaturas y acrónimos	21
1- Introducción	27
1.1- Tumores cerebrales primarios: el glioblastoma multiforme	27
1.1.1- Subclasificación molecular del glioblastoma multiforme	28
- Vías de señalización alteradas en los glioblastomas	30
- Estrategias terapéuticas actuales	30
- Hipótesis de las células troncales tumorales	34
1.2- Barrera hematoencefálica (BBB)	37
1.3- Administración de fármacos	38
1.3.1- Administración potenciada por convección (CED)	39
- CED de liposomas	41
1.3.2- Bomba osmótica	41
1.4- Vía de mTOR	42
1.4.1- mTOR: un complejo multi-proteico	42
1.4.2- Componentes de la vía con anterioridad al complejo mTOR (pre-mTOR) y su regulación	43
1.4.3- Componentes y regulación de la vía con posterioridad a mTOR (post-mTOR)	44
1.5- Rapamicina	45
1.5.1- Mecanismo antitumoral de la rapamicina	47
1.5.2- Ensayos clínicos	48
1.6- Irinotecan (CPT-11)	48
2- Objetivos	53
3- Materiales y métodos	57
3.1- Fármacos	57
3.1.1- In vitro	57
3.1.2- In vivo	57
3.2- Líneas celulares	57
3.3- Experimentos in vitro	58
3.3.1- Ensayo de viabilidad celular	58
3.3.2- Inmunocitoquímica	58
3.3.3- Medición de la proteína pS6 mediante ELISA	58
3.3.4- Extracción de proteínas para western blot	59
3.3.5- Western blot	59
3.3.6- Citometría de flujo	59
- Expresión de CD133	60
- Análisis del ciclo celular	60
3.3.7- Ensayo de agar blando	61
3.4- Experimentos in vivo	61
3.4.1- Animales	61
3.4.2- Implantación de tumores intracraneales	61
3.4.3- Administración potenciada por convección	63
3.4.4- Bomba osmótica	64
3.4.5- Tratamiento mediante inyección intraperitoneal (i.p.)	64
3.4.6- Imágenes de resonancia magnética	66

3.4.7- Evaluación de la toxicidad sistémica	66
3.4.8- Evaluación de la toxicidad en el cerebro	66
3.4.9- Inmunohistoquímica	66
3.4.10-Preparación de extractos de proteína in vivo para la cuantificación de pS6 mediante ELISA	66
3.4.11- Análisis estadístico	67
4- Resultados	71
4.1. Análisis del efecto de la rapamicina y el torisel a diferentes concentraciones en modelos de GBM in vitro e in vivo	71
4.1.1. Efecto citostático de la rapamicina y el torisel in vitro	71
4.1.2. Detección de pS6 in vitro mediante inmunocitoquímica	72
4.1.3. Detección de pS6 in vitro mediante ELISA	75
4.1.4. Estudio del ciclo celular in vitro	76
4.1.5. Detección de pS6 in vivo mediante inmunohistoquímica	78
4.1.6. Detección de pS6 in vivo mediante ELISA	80
4.1.7. Toxicidad sistémica	81
4.1.8. Prolongación de la supervivencia de animales con xenotransplantes intracraneales de U87MG tratados con rapamicina o torisel de forma sistémica	82
4.1.9. Tratamiento in vivo con rapamicina administrada de forma local y sistémica	84
4.2. Administración potenciada por convección de rapamicina o torisel: toxicidad y eficacia en modelos de glioma intracraneal en ratas	87
4.2.1. Estudio de la toxicidad tisular	87
4.2.2. Detección de pS6 in vivo por inmunohistoquímica tras la administración de los fármacos mediante CED	88
4.2.3. Detección de pS6 in vivo mediante ELISA tras la administración de los fármacos mediante CED	92
4.2.4. Toxicidad sistémica	93
4.2.5. Supervivencia de animales xenotransplantados ortotópicamente con U87MG y tratados con rapamicina mediante CED	94
4.3. Efecto de la rapamicina en células troncales tumorales derivadas de GBM humanos in vitro e in vivo mediante xenotransplantes ortotópico	95
4.3.1. Efecto de la rapamicina en la proliferación de las CSCs	95
4.3.2. Efecto de la rapamicina en la expresión de CD133	97
4.3.3. Efecto de la rapamicina en la capacidad de formación de colonias en agar blando	99
4.3.4. Efecto de la rapamicina en el estado de fosforilación de S6 y Akt en líneas establecidas CSCs in vitro	99
4.3.5. Efecto de la rapamicina en la autorrenovación de las CSCs	103
4.3.6. Monitorización del desarrollo de tumores intracraneales inducidos con U87MG y CSCs-5 mediante imágenes de resonancia magnética (MRI)	103
4.3.7. Análisis de la toxicidad sistémica derivada del tratamiento	105

4.3.8. Supervivencia de animales xenotransplantados ortotópicamente con CSCs-5 o U87MG tratados con rapamicina intraperitonealmente	106
4.4. Análisis del efecto de la terapia combinada de rapamicina y nanoliposomas cargados con CPT-11 in vitro y en modelos de xenotransplantes de GBM en roedores	109
4.4.1. Efectos citostático y citotóxico de rapamicina y nLs-CPT-11	109
4.4.2. Estudio del sinergismo de la combinación de rapamicina y nLs-CPT-11 in vitro (U87MG y U251MG)	111
4.4.3. Efecto del tratamiento combinado en la distribución del ciclo celular	111
4.4.4. Detección de pS6 in vitro por inmunocitoquímica tras la administración de los fármacos individualmente o en combinación	114
4.4.5. Optimización del patrón de administraciones para una terapia combinada de rapamicina con nLs-CPT-11	114
4.4.6. Análisis de la toxicidad sistémica del tratamiento in vivo con la combinación de rapamicina y nLs-CPT-11	116
4.4.7. Efecto terapéutico de la combinación de rapamicina y nLs-CPT-11 en modelos de tumor intracraneal U87MG	118
5- Discusión	123
5.1. Efecto de la rapamicina a distintas dosis, in vitro	123
5.2. Mejoras en el tratamiento de GBM humano con rapamicina, in vivo	125
5.3. Reducción de la toxicidad sistémica y aumento de la efectividad del tratamiento de GBM humano con rapamicina por administración mediante CED	127
5.4. Efecto de la rapamicina sobre CSCs derivadas de GBMs humanos	128
5.5. Aumento de la eficacia antitumoral de la combinación de rapamicina y CPT-11 frente a su uso individual	130
6- Conclusiones	135
Bibliografía	139

Abreviaturas y acrónimos

4EBP1	inhibidor de eIF-4E
Akt	del inglés: serine/threonine protein kinase; serín-treonín quinasa
ATP	adenosín trifosfato
BBB	del inglés: blood brain barrier; barrera hematoencefálica
BBBD	del inglés: blood brain barrier disruption; disrupción de la barrera hematoencefálica
BCSFB	del inglés: blood-cerebrospinal fluid barrier, barrera del fluído hemato-cerebroespinal
BSA	albúmina de suero bovino
BTB	del inglés: blood-tumor barrier; barrera hemato-cerebral
CBMSO	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
CD133	glicoproteína
cdk4	ciclina dependiente de quinasa 4
CED	del inglés: Convection Enhanced Delivery; administración potenciada por convección
CNS	del inglés: central nervous system; sistema nervioso central
CPT-11	irinotecan
CSCs	del inglés: cancer stem cells; células troncales tumorales
CSCs-5	células troncales tumorales del paciente 5
CSCs-7	células troncales tumorales del paciente 7
CSF	del inglés: cerebrospinal fluid; fluído cerebrospinal
D-PBS	del inglés: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; tampón salino
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMA	dimetil amina
DMEM	del inglés: Dulbecco modified Eagle's medium; medio de Eagle modificado por Dulbecco
EDTA	del inglés: ethylenediaminetetraacetic acid; ácido etilendiaminotetraacético,
EGFR	del inglés: epidermal growth factor; factor de crecimiento epidérmico
eIF4E	del inglés: Eukaryotic translation initiation factor 4E; factor de inicio de la traducción en eucariotas 4E
ELISA	del inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FKB12	FK506- proteína de unión, 12 kDa
GBM	glioblastoma multiforme
GβL	subunidad de mTOR con actividad GTPasa
GTP	guanisín trifosfato
HGF/SF	del inglés: hepatocyte growth factor/scatter factor; factor de crecimiento de hepatocitos

i.p.	intraperitoneal
IC	immunoquímica
IHC	immunohistoquímica
IP	yoduro de propidio
JAK-STAT	del inglés: Janus kinase- Signal Transducer and Activator of Transcription; quinas Janus- traductor e señal y activador de transcripción
mAc	anticuerpo monoclonal;
mLST8	subunidad de mTOR con actividad GTPasa
MRI	del inglés: Magnetic Resonance Imaging; imagen de resonancia magnética
MS	del inglés: Median Survival; media de supervivencia
mSIN1	proteína quinasa de mamíferos activada por estrés
mTOR-	del inglés: mammalian target of rapamycin; diana de la rapamicina en mamíferos
mTORC1	del inglés: mammalian target of rapamycin complex 1; complejo 1 de la diana de la rapamicina en mamíferos
mTORC2	del inglés: mammalian target of rapamycin complex 1; complejo 1 de la diana de la rapamicina en mamíferos
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro
NCI	del inglés: National Cancer Institute; instituto nacional del cáncer
NF1	neurofibromatosis 1
nLs-CPT-11	nanoliposomas cargados con CPT-11
NSC	del inglés: neural stem cells; células troncales tumorales
NSCs	del inglés: neural stem cells; células troncales neurales
O.D.	del inglés: Optic Density; densidad óptica
o.n.	del inglés: overnight; toda la noche
p16	inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
p21	quinasa inhibidora dependiente de ciclina 1
p70S6	del inglés: protein S6 kinase; proteína 6 quinasa
pAc	anticuerpo policlonal;
PBS	del inglés: Phosphate Buffered Saline; tampón fosfato salino
PDGF	del inglés: platelet-derived growth factor; factor de crecimiento derivado de plaqueta
PEG 400	del inglés: Polyethylene glycol; polietileno glicol
PFA	paraformaldehído
PI3K	del inglés: Phosphatidylinositol 3-kinase; fosfoinositol 3-quinasa
PKC	proteína quinasa C
PMSF	Fenil-metil-sulfonil fluoruro

PRAS40	substrato de AKT rico en prolina
pRb	proteína de retinoblastoma
pS6	del inglés: Phospho-S6 Ribosomal Protein; proteína ribosomal fosforilada S6
PTEN	del inglés: phosphatase and tensin homolog; fosfatasa y tensina homóloga
RLUs	del inglés: Relative Luminiscence Units; unidades relativas de luminiscencia
rnu/rnu	ratas desnudas atímicas
RT	temperatura ambiente
S6K1	del inglés: protein S6 kinase; proteína S6 quinasa
SDS	del inglés: sodium dodecyl sulfate, dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato
SN-38	7-etil-10-hidroxicamptotecina
TCGA	del inglés: the cancer genome atlas; atlas genómico del cáncer
TRAIL	del inglés: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de la necrosis tumoral
TSC1-TSC2-	del inglés: hamartin-tuberin complex; complejo tubero esclerosis
UCSF	del inglés: University of California San Francisco; Universidad de California San Francisco
UTR	del inglés: untranslated region; región no traducida
VEGF	del inglés: vascular endothelial growth factor; factor vascular endotelial de crecimiento
WB	western blot
WHO	del inglés: World Health Organization; organización mundial de la salud

Introducción

1.1- Tumores cerebrales primarios: el glioblastoma multiforme

Los tumores cerebrales primarios constituyen un grupo variado de neoplasias que proceden de diversos linajes celulares. Estos tumores son extremadamente mortales y relativamente poco frecuentes en comparación con otros tipos de cánceres. En Europa representan el 1.92% de los tumores, poseyendo una mortandad del 70% (Ferlay et al. 2010). En los Estados Unidos de América, representan el 1.49% de los tumores y poseen una tasa de mortalidad del 76%. Su frecuencia es de entre 15 y 20 casos por cada 100.000 habitantes [CBTRUS- Central Brain Tumor Registry of the United States, (CBTRUS 2010)]. Los tumores cerebrales malignos están entre las 10 principales causas de muerte relacionadas con el cáncer.

Los tumores cerebrales primarios han sido tradicionalmente clasificados de acuerdo con sus características morfológicas en base al origen filogénico del tejido. Los tumores de origen neuroepitelial engloban a un subgrupo de neoplasias conocidas como gliomas, las cuales representan entre el 40 y el 60% de los mismos (CBTRUS 2010); (Ferlay et al. 2010). La biología de los gliomas malignos es única. Aunque teóricamente pueden desembocar en una metástasis sistémica, esto es un hecho infrecuente. Los astrocitomas son uno de los tipos más frecuentes de gliomas y están subdivididos en cuatro grados siguiendo la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO). Los astrocitomas de grado I (astrocitomas pilocíticos) y grado II (astrocitomas difusos) representan las formas más benignas, mientras que los grados III (astrocitomas anaplásicos) y IV (glioblastoma multiforme) son los más malignos y agresivos, debido a su capacidad para infiltrarse en el tejido circundante, dificultando su erradicación mediante extracción quirúrgica (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Clasificación WHO de tumores astrocíticos y sus rasgos característicos

WHO (grado)	WHO (nombre)	Edad (en el diagnóstico)	Proporción Hombre /mujer	Supervivencia (años)
I	Astrocitoma pilocítico	10	1:1	Variable. Cura común
II	Astrocitoma difuso	34	1.18:1	5 (2-12+)
III	Astrocitoma anaplásico	41	1.8:1	2 (1-5)
IV	Glioblastoma multiforme	53	1.5:1	1 (0.25-1.5)

El glioblastoma multiforme (GBM) es el más frecuente y virulento de los tumores cerebrales primarios, representando el 50% de todos los gliomas (Surawicz 1998). Se trata de una neoplasia que puede tener origen astrocítico y que presenta un comportamiento extraordinariamente agresivo debido a la invasión de amplias áreas del parénquima cerebral. A menudo este tipo de tumores invaden el otro hemisferio cerebral a través del cuerpo calloso (“glioma en alas de mariposa”). Los GBMs pueden surgir en individuos previamente sanos (GBMs primarios) o pueden proceder de la transformación maligna de gliomas de grado bajo (GBMs secundarios). El término multiforme hace referencia a la alta heterogeneidad celular, constituyendo uno de los mayores problemas para su clasificación y gradación.

El diagnóstico en pacientes con gliomas malignos es todavía poco esperanzador. Su supervivencia media es de menos de un año desde el diagnóstico (Gupta and Sarin 2002), a pesar del uso multidisciplinar de cirugía, quimioterapia y radioterapia (Mitchell et al. 2005). Sólo el 5% de los pacientes sobrevive 5 años después de su diagnóstico. La completa eliminación del tumor mediante cirugía es a menudo imposible sin causar un daño neurológico severo debido a su rápido crecimiento, invadiendo el parénquima cerebral circundante (Holland 2000). La recurrencia del tumor tiene lugar generalmente en el tejido adyacente a la zona de la extracción, lo cual es coherente con su carácter altamente invasivo.

1.1.1- Subclasificación molecular del glioblastoma multiforme

Parte del esfuerzo realizado para comprender el proceso de formación del GBM se ha centrado en determinar alteraciones genéticas fundamentales. Dichas alteraciones afectan a genes implicados en procesos celulares clave como la transducción de señales, el crecimiento celular, el control del ciclo celular, la proliferación, la apoptosis y los procesos de diferenciación (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Principales alteraciones genéticas en GBM primarios

Alteración genética	Procesos celulares	Frecuencia (%)
EGFR	Transducción de señales	Amplificación 40% Sobreexpresión 60% Mutación 20-30%
MDM2	Arresto del ciclo celular	Amplificación <10% Sobreexpresión >50%
p16	Arresto del ciclo celular	Deleción 30-40%
PTEN	Transducción de señales	Mutación 30%
RB	Arresto del ciclo celular	Alteración 14%
TP53	Arresto del ciclo celular	Mutación 28%
PI3K	Transducción de señales	Mutación/Amplificación 20%

Los estudios genéticos y el análisis de los pacientes demuestran que existen diferentes subgrupos dentro de los 4 grados definidos por la WHO (Phillips et al. 2006; Brennan et al. 2009; Verhaak et al. 2010). Los estudios a gran escala de expresión génica en GBM han demostrado que los perfiles de transcripción reflejan la biología del tumor y pueden ser utilizados para su clasificación y la predicción de la respuesta a un tratamiento determinado (Van Meir et al. 2010). Un total de 4 subgrupos diferentes de GBM han sido definidos hasta la fecha: proneural o PDGF; clásico, proliferativo o EGFR; neural; y mesenquimal o NF1. Los perfiles de expresión génica de los distintos subgrupos de GBM muestran una fuerte correlación con los perfiles de expresión de los diferentes linajes celulares. El GBM proneural muestra un claro enriquecimiento en marcadores de oligodendrocitos. El subgrupo del GBM clásico está fuertemente asociado con la presencia de marcadores de astrocitos. El subgrupo del GBM neural está asociado a marcadores relacionados con la diferenciación de oligodendrocitos y astrocitos, pero también está fuertemente enriquecido en genes expresados en neuronas. El subgrupo de GBM mesenquimal está fuertemente relacionado con marcadores astrogiales. La recurrencia de tumores ha sido observada en todos los subtipos de GBM y los datos sugieren que los tumores no cambian de subgrupo durante el proceso de recidiva (Verhaak et al. 2010), (Tabla 1.3).

Uno de los aspectos más interesantes de definir subgrupos dentro de los tumores es que, de este modo, se puede estratificar mejor la terapia a aplicar en cada paciente, esperando una respuesta mucho más homogénea dentro de un subgrupo que entre distintos subgrupos. En el futuro se intuyen progresos en este área gracias al esfuerzo de la TCGA (The Cancer Genome Atlas).

Tabla 1.3 Distribución de genes habitualmente mutados en las subclases de GBM.

Gen	Proneural	Neural	Clásico	Mesenquimal
TP53	54 %	21 %	0 %	32 %
PTEN	16 %	21 %	23 %	32 %
NF1	5 %	16 %	5 %	37 %
EGFR	16 %	26 %	32 %	5 %
IDH1	30 %	5 %	0 %	0 %
PIK3R1	19 %	11 %	5 %	0 %
RB1	3 %	5 %	0 %	13 %
ERBB2	5 %	16 %	5 %	3 %
EGFRvIII	3 %	0 %	23 %	3 %
PIK3CA	8 %	5 %	5 %	3 %
PDGFRA	11 %	0 %	0 %	0 %

 Alteraciones génicas características de cada grupo

Vías de señalización alteradas en los glioblastomas

Introducción

Durante su desarrollo los GBMs muestran una variedad de alteraciones moleculares en las diferentes vías de señalización activas (Ohgaki 2005; Ohgaki and Kleihues 2007; Ohgaki and Kleihues 2009). Las hay que afectan a la señalización de factores de crecimiento, mientras que otras afectan a la regulación del ciclo celular. Dentro de las primeras, las más importantes son: las que alteran los receptores de membrana: PDGFR, EGFR; la señalización intercelular: VEGF, HGF/SF, las integrinas, MMPs/TIMPs; y la señalización intracelular: p21-RAS, PI3K-PTEN-Akt, JAK-STAT, y PKC. De las alteraciones que involucran al ciclo celular, algunas de las principales son: p53, Rb y p16/cdk4/ciclinaD/pRb (Fig. 1.1). Los procesos de transformación combinan la amplificación o sobreexpresión de oncogenes con la disminución o la desaparición de la expresión de los genes supresores de tumores. Las vías de señalización aberrantes pueden generar bucles autocrinos y paracrinos que estimulan la oncogénesis.

Estrategias terapéuticas actuales

Las cuatro estrategias terapéuticas más utilizadas actualmente para el tratamiento del GBM son: **cirugía, radioterapia, quimioterapia** y terapia dirigida con **fármacos moleculares específicos**.

La **cirugía** aplicada a gliomas malignos resulta un instrumento fundamental para el diagnóstico y la prevención de los síntomas debidos a la masa tumoral. Aunque la cirugía es normalmente la intervención inicial, la elección entre una resección agresiva del GBM en lugar de realizar una biopsia o resecciones parciales, ha sido uno de los temas de debate más controvertidos entre los neurocirujanos oncólogos (Hentschel 2005). Sin embargo, en la última década se ha incrementado el número de neurocirujanos que valoran positivamente la resección agresiva del GBM, no sólo para producir una citorreducción, sino también para controlar los síntomas y poder realizar un diagnóstico más preciso. El desarrollo de las técnicas de cirugía produce constantemente avances en la reducción del daño en el tejido sano circundante. El papel de la cirugía en el diagnóstico es incuestionable. El tejido obtenido en el momento de la operación es crítico para la realización de un análisis individualizado de los marcadores moleculares del tumor. El principal problema de la cirugía es la imposibilidad de alcanzar una resección completa del tumor debido a la capacidad de las células tumorales para infiltrarse en el parénquima, alejándose de la masa tumoral principal. Estas células son las responsables de las inevitables recidivas de este tipo de tumores.

La **radioterapia** ha sido utilizada en el tratamiento de neoplasias cerebrales durante las últimas seis décadas (Bouchard 1958). El primer resultado prometedor en estudios clínicos demostraba que la radioterapia post-cirugía producía una supervivencia media de 37,5 semanas en pacientes tratados sólo con radioterapia frente a 17-25 semanas en pacientes tratados de forma convencional (Walker et al. 1978). Aunque el tipo de radiación usada para el tratamiento de gliomas malignos no ha cambiado sustancialmente durante

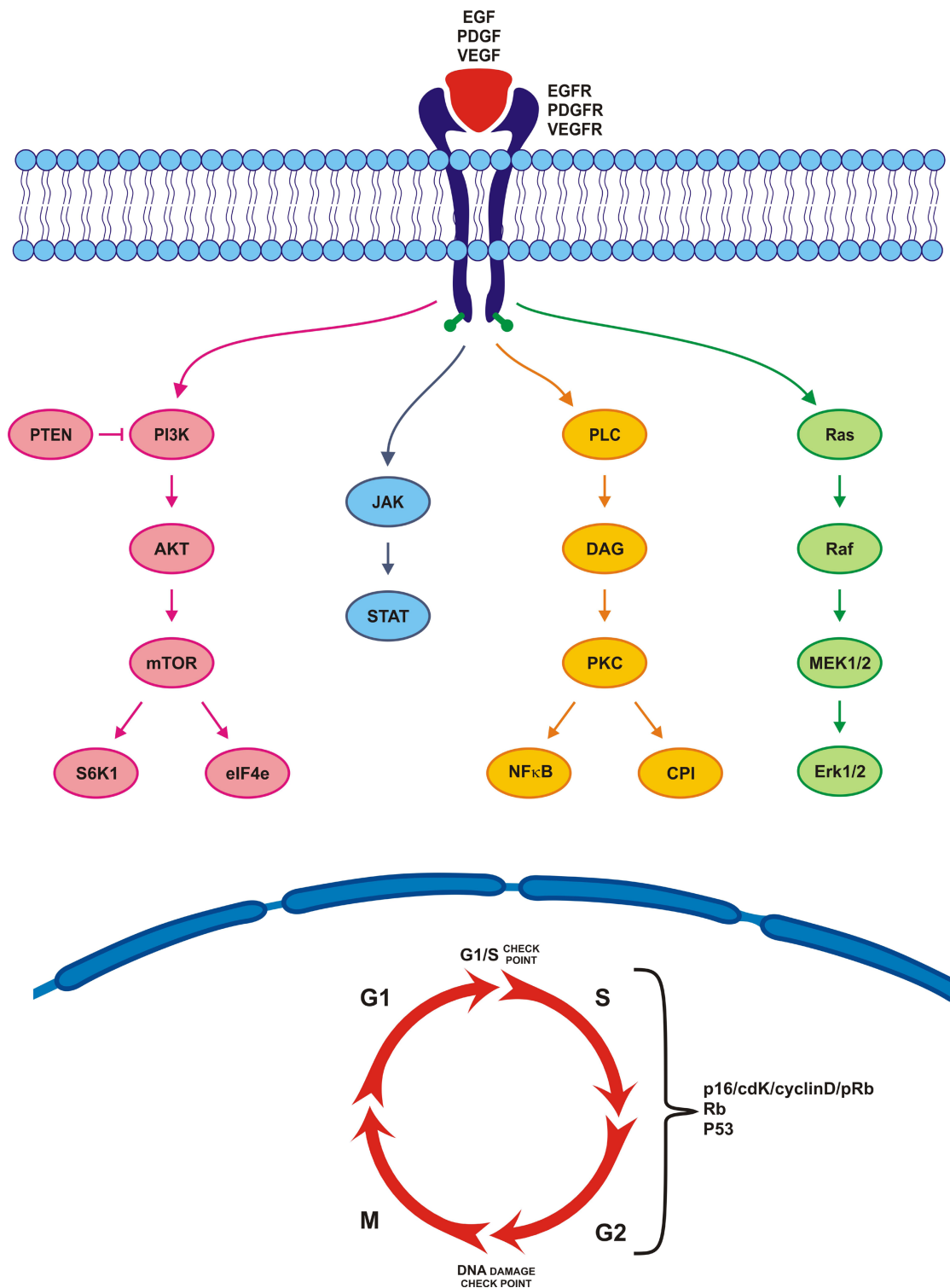


Fig. 1.1 Representación esquemática de las vías de señalización aberrantes más frecuentes en GBMs.

décadas, la capacidad de minimizar la dosis de radiación recibida por el tejido sano circundante se ha mejorado considerablemente. El tratamiento mediante radioterapia estándar para esta enfermedad consiste en la radiación parcial de la zona del cerebro afectada durante aproximadamente 6 semanas. Con el objetivo de minimizar la radiación del tejido normal, la región es localizada usando resonancia magnética (MRI) (Chan et al. 2003). Aunque los GBM son habitualmente tratados con radioterapia, presentan una radioresistencia significativa. La gran mayoría de los tumores tratados sufre recurrencia dentro de la región tratada con alta dosis de radiación. No se ha conseguido probar que la intensificación de las dosis altere significativamente el curso de la enfermedad (Chan et al. 2002). La recurrencia de los tumores es debida a su capacidad de incrementar la supervivencia en las zonas tratadas con radiación mediante la alteración de las vías de señalización (Noda et al. 2009).

La quimioterapia tradicional utiliza agentes que se pueden clasificar como citotóxicos o citostáticos. Los mecanismos de actuación comunes a los agentes citotóxicos usados en el tratamiento de GBM son: la alquilación del DNA, el entrecruzamiento del DNA, la ruptura de hebras del DNA y la disrupción del huso mitótico. Los agentes citostáticos alteran la biología del tumor inhibiendo el crecimiento, la propagación o ambos mecanismos, pero no afectan a la viabilidad de las células tumorales directamente. Los mecanismos utilizados son: promover la diferenciación, inhibir la angiogénesis, inhibir la invasión del tumor y bloquear las vías de diversos factores de crecimiento. Los agentes pueden ser administrados solos (Brada et al. 2001; Prados et al. 2006); o en combinación (Brada et al. 2001; Prados et al. 2006; Prados et al. 2008; Prados et al. 2009). Los agentes quimioterapéuticos usados en la actualidad están resumidos en la Tabla 1.4.

Los beneficios obtenidos por la quimioterapia han sido modestos, y su utilidad ha sido puesta en duda en el tratamiento del GBM. Existen varios problemas para lograr un tratamiento efectivo, como la resistencia a la quimioterapia, la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés: Brain Blood Barrier), y la toxicidad.

La mayoría de los agentes quimioterapéuticos citotóxicos inducen la muerte celular mediante la alquilación y el entrecruzamiento del DNA. La presencia de enzimas reparadoras del DNA dentro de las células tumorales producen la eliminación del grupo alquilo introducido por el agente, revirtiendo así el proceso letal y protegiendo a las células.

Otra línea de investigación importante para la comprensión de la resistencia a la quimioterapia es examinar la resistencia que presentan las células troncales tumorales. Además de la quimioresistencia, existe el problema del acceso de los agentes quimioterapéuticos a los tumores cerebrales: la presencia de la BBB restringe su libre difusión. Se han buscado soluciones a este problema tales como la modificación o ruptura de la BBB y la quimioterapia intratumoral: inyección directa, inyección intra-arterial, esponjas biodegradables y envío mediante administración potenciada por convección (CED).

Tabla 1.4 Fármacos habituales en quimioterapia

Fármaco	Mecanismo de acción	Combinaciones
Temozolomida (TMZ)	Metilación del DNA	Cisplatino, BCNU, talidomida, doxorubicina, irinotecan
Carmustina (BCNU)	Agente alquilante	TMZ, irinotecan, cisplatino, tamoxifeno
Procarbazina	Agente alquilante	CCNU+vincristina=(PCV), fotemustina, CCNU, TMZ
Lomustina (CCNU)	Agente alquilante	Procarbazina + vincristina=(PCV), adriancina + VM 26 misonidazol
Vincristina	Disolución del huso mitótico	Procarbazina + CCNU = (PCV), DTIC + ACNU, mecloretamina + procarbazina
Carboplatino	Entrecruzamientos en la misma hebra de DNA	Ifosfamida + VP-16, erlotinib, tamoxifeno, VP-16
Etoposido (VP-16)	Ruptura DNA, actúa sobre topo I y II	Carboplatino, bevacizumab, Ifosfamida + carboplatino, TMZ
Irinotecan (CPT-11)	Inhibe a la topoisomerasa I	TMZ, BCNU, Cetuximab + bevacizumab, talidomida
Ácido Cis-Retinoico	Provoca un fenotipo menos agresivo de GBM	Celecoxib, TMZ, interferón-a, interferón-b,
Talidomida	Antiangiogénico	Irinotecan, TMZ, Carboplatino+vincristina+fluvastatin
Tamoxifeno	Inhibe actividad proteín quinasa C	Celecoxib, TMZ, Cisplatino + etopósido
Celecoxib	Anti-inflamatorio, inhibidor de cyclooxygenasa-2	Topotecan + carboplatino, TMZ, TMZ + talidomida



Agentes citotóxicos



Agentes citostáticos

Por otro lado, se ha observado que el tratamiento con un único agente no es efectivo, por lo que se ha ensayado la efectividad de combinaciones de diferentes agentes. Uno de los problemas que presenta la quimioterapia combinada es la toxicidad; resulta necesario reducir las dosis, lo cual puede provocar un descenso de la efectividad del tratamiento.

El tratamiento multidisciplinar incluyendo cirugía, radioterapia y quimioterapia es una estrategia ampliamente aceptada para el GBM. La quimioterapia puede ser administrada en diferentes momentos en relación con los otros tratamientos. El tratamiento complementario es aplicado en el momento del diagnóstico y después de la cirugía y/o radioterapia. El tratamiento neo-complementario es suministrado después de otras modalidades de tratamiento como la radioterapia. La quimioterapia puede también suministrarse simultáneamente con otras terapias como la radioterapia. La quimioterapia es utilizada habitualmente en el momento de la recurrencia del tumor.

Las alteraciones encontradas en las vías de señalización que se han identificado en gliomas malignos (Fig. 1.1), han dado lugar a una primera generación de **fármacos moleculares específicos** diseñados para inhibir dichas vías con un objetivo terapéutico. Cuando se utilizan agentes únicos se obtiene una actividad modesta, con porcentajes de respuesta de 10% a 15% sin prolongación de la supervivencia (Wen and Kesari 2008). El fracaso puede deberse a la existencia de vías múltiples paralelas o compensatorias. Además, los gliomas malignos son genéticamente heterogéneos por lo que dirigir el tratamiento contra una única vía puede no ser suficiente para controlar el tumor (Sathornsumetee et al. 2007). Además, muchos fármacos moleculares tienen una escasa capacidad de penetración de la BBB.

Actualmente las estrategias experimentales para incrementar la efectividad de los fármacos moleculares específicos van encaminadas a interferir con la señalización de múltiples vías o incluso distintas dianas dentro de la misma vía mediante el uso de terapias combinadas (Tabla 1.5). En la actualidad resulta primordial diseñar una estrategia para determinar la combinación que resulte más efectiva. La comprensión de las propiedades farmacológicas de cada agente utilizado en la combinación es importante, dado que en ocasiones puede existir un antagonismo entre los agentes empleados.

Hipótesis de las células troncales tumorales

El cerebro humano adulto se ha considerado durante mucho tiempo como un órgano estático completamente diferenciado. Esta idea ha evolucionado y en nuestros días, se considera al cerebro como una estructura dinámica formada por una compleja relación jerárquica de poblaciones celulares, en la cual las células troncales neurales (NSCs, neural stem cells) mantienen las poblaciones de células maduras funcionales. Dado que los organismos viven durante mucho más tiempo que sus células diferenciadas, los tejidos y los órganos necesitan ser regenerados. Las células troncales reemplazan esas células perdidas y además son únicas en cuanto a su capacidad de autorregeneración, proporcionando una fuente estable de precursores para los tejidos (Cheshier et al. 2009).

Tabla 1.5 Resumen de los fármacos de terapia dirigida actualmente usados en el tratamiento clínico de gliomas de alto grado

Diana primaria	Agente	Dianas secundarias	Combinaciones
EGFR	Gefitinib (ZD1839)		
	Erlotinib (OSI-774)		TMZ
	Lapatinib (GW-572016)	HER-2	
	PF-00299804	HER-2, HER-4	
	BIBW2992	HER-2, HER-4	
	Cetuximab		
	Nimotuzumab		
EGFRvIII	CDX110		
Ras	Lonafarnib (SCH66336)		TMZ
	Tipifarnib (R115777)		TMZ
FGFR	Brivanib (BMS-582664)	VEGFR2	
HDAC	Vorinostat (SAHA)		TMZ
	Ácido valproico		RT + TMZ
	LBH589		
HGF/SF	AMG102		
HSP-90	17-AAG		
Integrinas	Cilengitido(EMD121974)		RT
HGFR	XL184	VEGFR	
mTOR	Sirolimus (Rapamicina)		Geftinib
	Everolimus (RAD001)		AEE788
	Temsirolimus (CCI-779)		Erlotinib
	Ridaforolimus (AP23573)		
PDGFR-a	IMC3G3		
PDGFR-b	Imatinib	BCR/Abl, c-Kit	
	Desatinib	Src, BCR/Abl	
	Tandutinib (MLN518)	cKit, ephrin A2	
PI3K	XL765	Flt3, c-Kit	
		mTOR	
PKC	Enzastaurin (LY31761)		
VEGF-A	Aflibercept (VEGF Trap)	VEGF-B, PlGF	
	Bevacizumab		Irinotecan
VEGFR	Vatalanib		TMZ, lomustina
	Avastin		

Modificado de [Sathornsumetee et al. \(2007\)](#); [Wen and Kesari \(2008\)](#); [Van Meir et al. \(2010\)](#)

Las células troncales neurales presentan tres características importantes: (1) la capacidad ilimitada para autorrenovarse, lo cual permite el mantenimiento de una reserva de células troncales durante la vida del organismo; (2) la “autorregulación” del número de células troncales; y (3) la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares que componen el tejido de origen.

Los recientes avances en el campo de las células troncales han permitido el desarrollo de la hipótesis de las células troncales tumorales (CSCs, del inglés: cancer stem cells) (Reya et al. 2001). Este concepto defiende la existencia de una pequeña población de células tumorales (CSCs) con propiedades de células troncales responsables de originar y mantener el tumor. Esta población tendría la capacidad tanto de autorrenovarse como de diferenciarse hacia todos los tipos celulares que componen el tumor. La tumorigenicidad de las células se pierde progresivamente durante el proceso de diferenciación, por lo que las CSCs serían las únicas células capaces de originar el tumor (Clarke et al. 2006) (Fig. 1.2.A).

De acuerdo con la hipótesis de las CSCs, cualquier terapia contra el tumor cerebral que no logre erradicar las CSCs tendrá como resultado la recidiva a partir de las CSCs residuales (Schulenburg et al. 2006). Estudios recientes sugieren que las CSCs derivadas de GBMs son resistentes a las terapias complementarias estándar para el tratamiento de gliomas, a la radioterapia (Bao et al. 2006) y la quimioterapia incluida la temozolomida (Clement et al. 2007), (Fig. 1.2.B). Por estos motivos, el desarrollo de

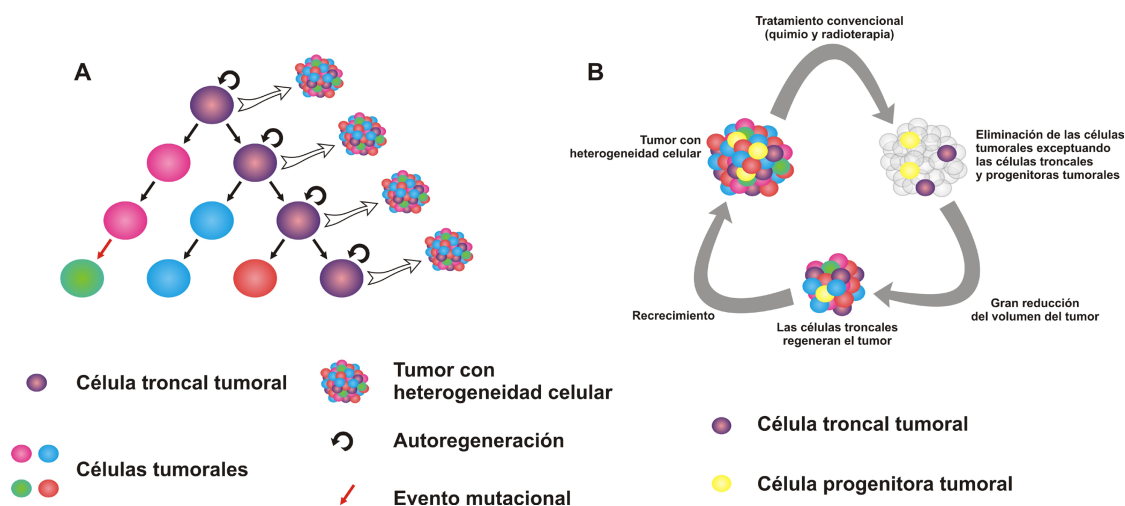


Fig. 1.2 Hipótesis de las células troncales tumorales. (A) Modelo jerárquico, el cual predice que un subgrupo de células determinado presenta la capacidad de generar nuevos tumores, mientras que la mayoría de las células tumorales carecen de dicha capacidad. (B) Según esta hipótesis los tumores se mantienen gracias a un pequeño grupo de células quimio y radioresistentes, con capacidades de autorrenovación y diferenciación. Las terapias convencionales ayudan a reducir la masa del tumor; sin embargo, las CSCs residuales en el tumor reducido provocan la recurrencia.

tratamientos que tengan como diana las CSCs es actualmente un objetivo fundamental.

Desde que las células troncales fueron aisladas, se han observado varias vías que pueden jugar un papel importante en el mantenimiento de su estado troncal. Algunas de las vías que han sido analizadas son: Sonic Hedgehog, Notch, Jak/Stat y PI3K/Akt. Muchas de ellas están también implicadas en la tumorigénesis. La inhibición de dichas vías puede resultar en un beneficio clínico en el tratamiento de pacientes con cáncer (Hambardzumyan et al. 2008a; Hambardzumyan et al. 2008b; Bleau et al. 2009).

1.2- Barrera hematoencefálica (BBB)

El sistema nervioso central (CNS) es un órgano fuertemente protegido por barreras que regulan la homeostasis cerebral y controlan el transporte de componentes endógenos dentro del cerebro. El concepto de barrera hematoencefálica fue desarrollado hace más de 100 años, al evidenciarse que cuando se aplicaba una inyección intravenosa con un agente coloreado, la mayoría de los órganos quedaban teñidos por el agente, a excepción del cerebro y la espina dorsal (Ehrlich 1885).

En el cerebro y la espina dorsal de los mamíferos, la BBB está producida por las células endoteliales que forman las paredes de los capilares cerebrales. El área de las paredes de todos estos microvasos constituye la mayor superficie de intercambio existente de la sangre cerebral, proporcionando una defensa natural contra los agentes de carácter tóxico o infeccioso que circulan en la sangre. La relativa impermeabilidad de la BBB se debe a las uniones estrechas entre las células endoteliales de los capilares.

La segunda interfase está formada por las células epiteliales del plexo coroideo dispuestas de cara al fluido cerebroespinal, lo que constituye la barrera hemato-fluido cerebrospinal (BCSFB). Algunos fármacos y solutos penetran en el cerebro principalmente a través del plexo coroideo, pasando al fluido cerebroespinal (CSF).

La tercera interfase está formada por el epitelio aracnoide de carácter avascular, localizado por debajo de la *dura mater*, que cubre por completo el SNC. Aunque el epitelio aracnoide también forma una capa-barrera, debido a su naturaleza avascular y el área relativamente pequeña que tiene, no representa una superficie de intercambio importante entre la sangre y el SNC (Abbott et al. 2010) (Fig. 1.3).

La función de barrera resulta de la combinación de las barreras física, de transporte y metabólica (Gabathuler 2010). Las barreras restringen el acceso hasta las células cerebrales permitiendo la entrada solamente a: (1) pequeñas moléculas hidrófilas como aminoácidos, glucosa, y otras moléculas necesarias para la supervivencia de las células cerebrales; (2) moléculas esenciales grandes de carácter hidrófilo como hormonas, transferrina y lipoproteínas; (3) pequeñas moléculas lipófilas mediante difusión pasiva.

Se ha observado que la BBB se interrumpe en el contexto de los tumores de alto grado, pero, aun así, actúa todavía como una barrera contra muchos fármacos, particularmente en la periferia del tumor (Clarke et al. 2010). Existe además una barrera específica del tumor, la barrera hematotumoral (BTB, del inglés: brain tumor barrier) con importantes diferencias respecto a la BBB normal (Provenzale et al. 2005). Existen

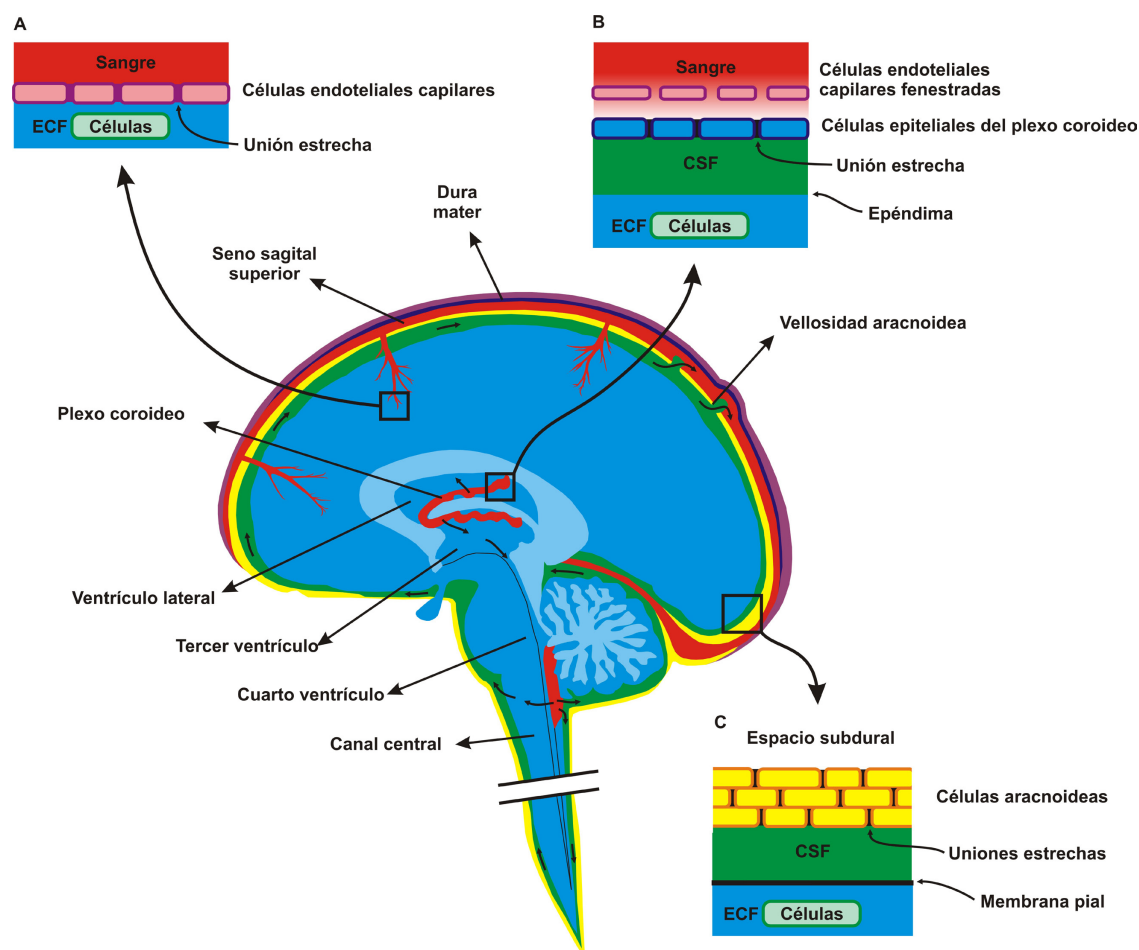


Fig. 1.3 Localización de las tres principales barreras entre la sangre y el cerebro. (A) La BBB, tiene lugar en los capilares que irrigan el cerebro, cuyas células endoteliales presentan uniones estrechas. (B) La BCSFB, está localizada en el plexo coroideo en los ventrículos lateral, tercero y cuarto del cerebro donde las células epiteliales presentan también uniones estrechas en la superficie epitelial de cara al CSF. (C) La barrera aracnoidea; el cerebro está envuelto por una membrana aracnoidea situada bajo la dura mater. El epitelio aracnoideo es una multicapa que presenta uniones estrechas entre las células en la capa interna que forma una barrera efectiva. (ECF- extracelular fluid fluido extracelular; CSF- cerebrospinal fluid fluido cerebroespinal). Figura modificada de (Abbott et al. 2010).

distintas poblaciones de microvasos en la BTB que poseen propiedades distintas a sus equivalentes fisiológicos: (1) una población de microvasos continua no fenestrados, como los del cerebro normal; (2) una población de microvasos continua, con capilares fenestrados; y (3) una población de capilares con huecos interendoteliales que pueden llegar a medir hasta 1 μm (Groothuis 2000).

1.3- Administración de fármacos

La función fisiológica de la BBB de conservar la homeostasis mediante el transporte selectivo de nutrientes, implica una restricción para la efectividad de las terapias

utilizadas contra el tumor cerebral. Solamente pequeñas moléculas lipófilas pueden pasar, mediante difusión pasiva a través de la BBB. Pequeñas moléculas hidrófilas (aminoácidos, glucosa y otras moléculas necesarias para la supervivencia de las células cerebrales) y moléculas de mayor tamaño o moléculas esenciales hidrófilas (hormonas y lipoproteínas) utilizan transportadores y receptores específicos respectivamente (Gabathuler 2010).

Algunas estrategias para mejorar la eficacia en la introducción de los fármacos en los tumores cerebrales han sido probadas en investigaciones preclínicas y clínicas. Estas estrategias incluyen entre otras: (1) administración de fármacos de forma no invasiva y sin disrupción de la BBB, basada en la reformulación de medicamentos facilitando de esta manera el transporte dentro del cerebro mediante el incremento de la solubilidad y estabilidad en el plasma (como, por ejemplo, la conjugación directa de medicamentos antitumorales para aumentar la lipofilicidad o la co-administración de agentes quimioterapéuticos con inhibidores de transportadores de flujo); (2) envío fisiológico no invasivo de medicamentos mediante transportadores como nanopartículas, liposomas, o micelas poliméricas; (3) estrategias de envío invasivo del medicamento (como son el envío intra-arterial con disrupción de la BBB, la administración potenciada por convección o las esponjas impregnadas de agentes quimioterapéuticos (Laquintana et al. 2009).

1.3.1- Administración potenciada por convección (CED)

La administración potenciada por convección (CED, del inglés: convention enhanced delivery) es una opción experimental en el tratamiento de tumores cerebrales. Consiste en la administración intracraneal directa del fármaco mediante un mecanismo de flujo positivo que transporta y distribuye macromoléculas a regiones concretas (Bobo et al. 1994). El CED presenta varias ventajas comparado con otros métodos tradicionales de administración de medicamentos: (1) evita la BBB por lo que se puede usar para descargar agentes terapéuticos con independencia de su peso molecular; (2) proporciona un aterrizaje directo en la región del cerebro escogida donde se introduce el catéter; esta capacidad de escoger el área diana sirve para limitar posibles toxicidades, de tipo sistémico y neurológico; (3) el CED permite asimismo un mayor volumen de distribución que los métodos tradicionales; (4) la concentración del agente que se alcanza en el tumor es 100 veces mayor que en el caso de la administración intratecal y entre 1000 y 10000 veces mayor que con la administración intravenosa (Huynh et al. 2006; Ferguson et al. 2007; Bidros and Vogelbaum 2009).

Existen algunos factores que afectan a la distribución de los medicamentos cuando se suministran mediante CED. Estos factores son: la velocidad de la descarga, el tamaño de la cánula, el volumen de la entrega, la presión intersticial de fluidos, las características de la partícula administrada y la estructura del tejido tumoral. Una de las limitaciones del CED en los cerebros de roedores es que velocidades de descarga de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ y mayores inducen un incremento del daño del tejido en el extremo de la cánula.

Velocidades de 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ muestran volúmenes de distribución similares a los obtenidos a velocidades de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$; se ha observado que velocidades menores de suministro reducen el daño en el tejido, incrementando el volumen de la distribución (Krauze et al. 2005).

Introducción

Los diferentes tamaños de la cánula muestran distintos patrones de difusión. La aguja de calibre 32, una de las agujas metálicas mas pequeñas comercialmente disponibles, presenta reflujo; en cambio, la aguja de calibre 27 (0,416 mm de diámetro externo) de sílice presenta una reducción del reflujo (Krauze et al. 2005).

Se han diseñado distintos modelos de la cánula con el objetivo de reducir el reflujo producido durante la administración, alcanzándose una dramática reducción con la cánula escalonada (consistente en dos tubos de sílice montado uno dentro de otro) (Yin et al. 2010), (Fig. 1.4).

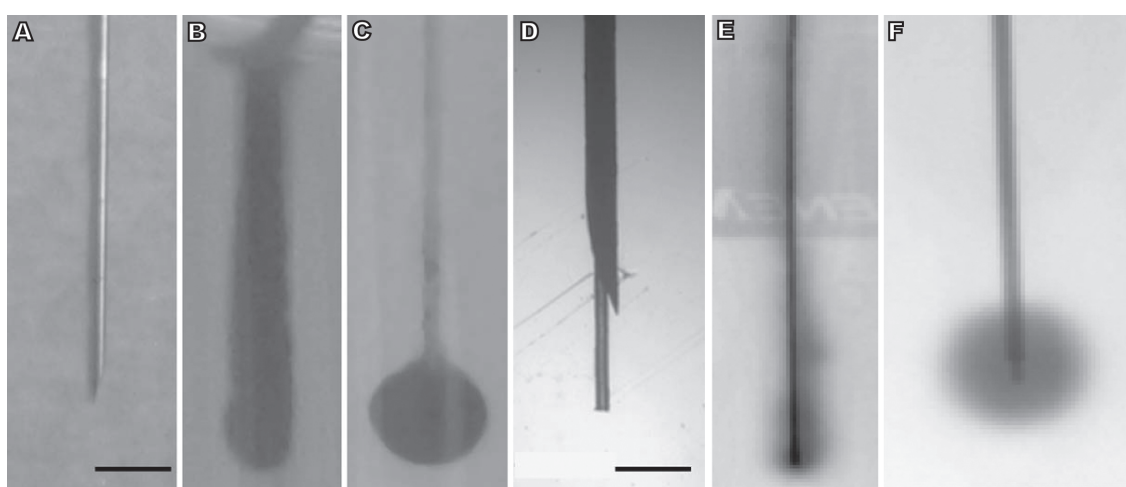


Fig. 1.4 Distribución de azul de tripano en gel de agarosa mediante CED. (A) Cánula comercial con aguja de calibre 24 (0,558 mm de diámetro externo); (B) reflujo del azul de tripano a lo largo del eje generado por la aguja de calibre 24 en gel de agarosa a 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. (C) Distribución mejorada de azul de tripano en gel de agarosa con una cánula con diseño escalonado a 1 $\mu\text{l}/\text{min}$; (D) cánula con diseño escalonado consistente en una aguja de calibre 24 con un inserto de cánula de sílice. (La barra de escala en la imagen (A) es igual a 1 cm, la barra de escala en la imagen (D) es igual a 1 mm). (E) CED con una cánula de sílice sin diseño escalonado; $v = 79 \mu\text{l}$, velocidad = 3 $\mu\text{l}/\text{min}$. (F) CED usando una cánula con un escalón de 1-mm; $v = 79 \mu\text{l}$, velocidad 3 $\mu\text{l}/\text{min}$. (La aguja presenta un diámetro interior de 319 μm y un diámetro exterior de 431 μm con un tubo de sílice insertado que tiene un diámetro interior de 99 μm y un diámetro exterior de 236 μm . Figura modificada de (Krauze et al. 2005; Yin et al. 2010).

Las características de la descarga muestran una diferencia en el volumen de la distribución entre agentes fluorescentes hidrofílicos y lipofílicos observándose un mayor volumen de la distribución para los agentes hidrofílicos (Saito et al. 2006).

Debido al potencial del CED como método de distribución de medicamentos en el SNC, ya ha sido utilizado en más de 50 ensayos clínicos con pacientes con GBM (National Cancer Institute (NCI) database, www.nci.nih.gov). El sistema CED es una prometedora técnica que ya ha alcanzado un cierto éxito en algunos ensayos clínicos.

Algunas mejoras en el futuro probablemente incrementarán la eficacia del CED resolviendo las limitaciones de esta técnica, tales como la utilización de sistemas de obtención de imágenes a tiempo real durante el CED que hará posible la monitorización de la distribución del agente y también la encapsulación de los medicamentos que incrementará en términos generales la eficacia terapéutica de los agentes tóxicos (Ferguson et al. 2007).

CED de liposomas

El primer ensayo realizado en el cual se administraron liposomas mediante CED, fue realizado por Mamot et al. (2004). Los liposomas pueden dar una encapsulación estable para la administración de una gran cantidad de potentes fármacos anticancerígenos (Drummond et al. 1999). La aplicación mediante CED de liposomas cargados pueden ser una buena opción para el tratamiento de GBM.

La CED de liposomas que contienen agentes farmacéuticos, parece alcanzar una amplia y eficiente distribución en cerebros normales de roedores y en xenotransplantes de tumores intracraneales, manteniéndose la gran parte del agente contenido en la región de descarga (Saito et al. 2004).

En estos casos los liposomas penetraron eficientemente el tejido tumoral cerebral. Además se ha observado que la distribución liposomal se frena en el momento que la bomba deja de funcionar. Esto es un dato importante debido a que permite cubrir zonas específicas del tumor con una cantidad conocida de liposomas y por lo tanto, de fármaco encapsulado, de una manera muy controlada (Krauze et al. 2006).

Una vez que se ha finalizado la CED, el contenido de los liposomas es liberado por difusión en el área del tumor en el que ha tenido lugar la convección. Esta lenta liberación conduce a una drástica mejora de las propiedades farmacocinéticas del agente encapsulado. La liberación lenta y constante de fármacos asociados a liposomas origina poca toxicidad y una mayor eficacia cuando se compara con la liberación del fármaco-libre en xenotransplantes de tumores cerebrales de roedores.

Ya se han utilizado en modelos animales liposomas cargados con doxorubicina (Yamashita et al. 2006), topotecan (Saito et al. 2006), o CPT-11 (Noble et al. 2006) mediante CED. También se han ensayado combinaciones (Krauze et al. 2007) y demostrado su validez en modelos caninos (Dickinson et al. 2008); en todos los casos se consiguió incrementar la supervivencia de los animales tratados con CED y liposomas.

1.3.2- Bomba osmótica

Las bombas osmóticas han sido muy utilizadas como método de administración intratumoral directa. Ofrecen la posibilidad de que los agentes empleados alcancen una concentración terapéutica de forma rápida. La tecnología de las bombas osmóticas es especialmente atractiva para moléculas que tienen actividades sistémicas o periféricas que resultan en un efecto negativo, o para fármacos estables que son efectivos pero

tienen una limitada penetrancia en el tejido de interés.

El reservorio de la bomba osmótica es implantado subcutáneamente y el medicamento es liberado desde el reservorio, mediante un tubo de silicona, a una cánula localizada en el tejido diana (Shoichet and Winn 2000).

Introducción

Las ventajas de las bombas osmóticas son: consiste en un sistema de descargas continuadas a ritmo constante; el tiempo de liberación del fármaco es ampliado al tiempo en el cual la rata lleva la bomba osmótica; el medicamento es administrado sin intervención del investigador una vez la bomba está instalada; el tratamiento permite el movimiento libre del animal; comparado con los implantes biodegradables, las bombas han demostrado una mejora en la liberación (Mairs et al. 2000) y además, los dispositivos son muy ligeros comparados con otras jeringuillas-bomba portátiles (Cooper et al. 2007).

Pese a todas estas ventajas, se han encontrado serias limitaciones en el uso de las bombas osmóticas debido a la necesidad de la aplicación de una presión que conduzca a la liberación del fármaco, que en algunos casos resulta en una liberación inconstante del medicamento (Ommaya 1984; Stahl 1988). Además pueden también fallar debido a obstrucciones de la cánula causadas por la precipitación del fármaco u otras sustancias.

Las bombas osmóticas han sido utilizadas en una gran cantidad de estudios en los que se requiere la liberación de un fármaco a una zona concreta del organismo del animal (ALZET 2010).

1.4- Vía de mTOR

La vía de señalización de la diana de la rapamicina de mamíferos (mTOR, del inglés: mammalian target of rapamycin), se encuentra con frecuencia alterada en GBM. La vía de mTOR integra señales intracelulares y extracelulares; actúa como interruptor celular del catabolismo y anabolismo celular regulando de esta forma el crecimiento celular, la proliferación, la organización del citoesqueleto, la transcripción del DNA, la síntesis de proteínas, la biogénesis ribosomal y la supervivencia celular (Faivre et al. 2006). Su activación es aberrante en muchos tipos de tumores: pancreático, gástrico, ovárico, de mama y GBM [(CGARN) 2008; Parsons et al. 2008].

1.4.1- mTOR: un complejo multi-proteico

La proteína mTOR es una serín-treonín quinasa de 289-kDa, que pertenece a la familia de las quinasas relacionadas a PI3K (Phospholinositide 3-Kinase), ha sido conservada a lo largo de toda la evolución.

En las células de mamíferos mTOR existe en al menos dos complejos físicos y funcionalmente diferentes, comúnmente conocidos como complejo 1 (mTORC1) y complejo 2 (mTORC2).

El mTORC1, entre otras funciones, estimula el crecimiento y proliferación celular mediante el aumento de la iniciación de la traducción dependiente de cap en respuesta

a nutrientes, hormonas y factores de crecimiento; inhibe la autofagia; juega un papel importante en la regulación de síntesis de lípidos y en el metabolismo y biogénesis mitocondrial; además probablemente participa en la modulación de la síntesis de proteínas (Laplane and Sabatini 2009a).

El complejo consta de cinco componentes: mTOR es la subunidad catalítica; Raptor, la proteína reguladora asociada a mTOR; GβL, también conocida como mLST8, es la subunidad con actividad GTPasa; PRAS40, substrato de AKT rico en prolina y Deptor, con la región DEP que contiene la proteína relacionada con el mTOR (Dowling et al. 2010). La función exacta de la mayoría de las proteínas relacionadas con mTOR no está todavía bien definida.

Se ha descrito la implicación del complejo mTORC2 en supervivencia celular, proliferación y la organización del citoesqueleto (Sarbasov et al. 2004; Sarbasov et al. 2005), pero en contraste con el complejo mTORC1, el conocimiento de la biología de mTORC2 es todavía muy escaso. Este complejo está compuesto por 6 proteínas diferentes, varias de las cuales son comunes a mTORC1: mTOR; Rictor, compuesto insensible a rapamicina; mSIN1, proteína quinasa de mamíferos activada por estrés; Protor-1, proteína 5 rica en prolina; mLST8 y Deptor (Dowling et al. 2010) (Fig. 1.5).

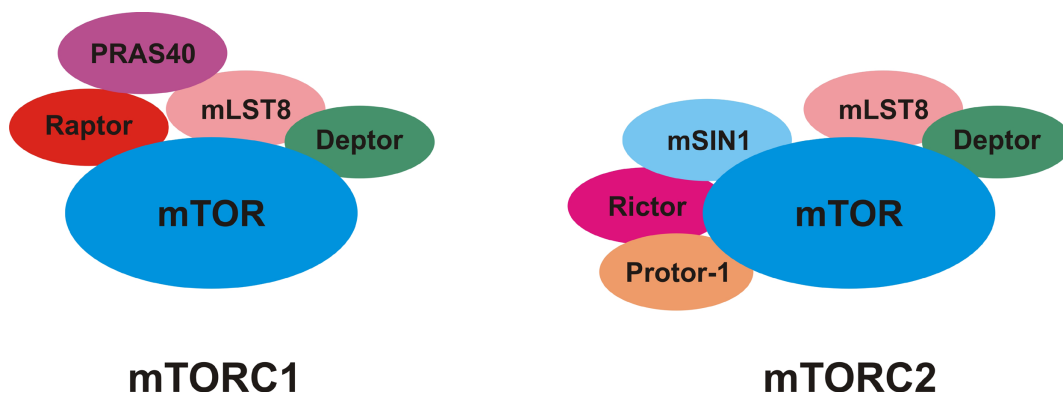


Fig. 1.5 Diferencias entre mTORC1 y mTORC2. mTOR, la subunidad catalítica, Deptor- DEP-dominio y las subunidades gβL o mLST8, GTPasa, están presentes en ambos complejos. Las subunidades específicas del mTORC1 son: PRAS40 (substrato rico en prolina), y Raptor (regulador-asociado). Mientras que las subunidades específicas del mTORC2 son: mSIN1 (proteína de estrés en mamíferos), Protor-1 (proteína 5 rica en prolina) y Rictor (componente insensible a rapamicina).

1.4.2- Componentes de la vía con anterioridad al complejo mTOR (pre-mTOR) y su regulación

La regulación pre-mTORC1 es compleja y comprende la integración de multitud de señales. Los principales componentes cuya alteración afecta a la regulación pre-mTORC1 en GBM son: sobre-expresión o mutación de EGFR (del inglés: epidermal growth factor receptor), detectado en el 45% de los pacientes; pérdida de función de PTEN que ocurre en más del 50%; mutación o amplificación de la unidad catalítica o

reguladora de PI3K, sucede en más del 10% y amplificación de Akt, en aproximadamente el 2% de los pacientes (Akhavan et al. 2010).

El complejo mTORC1 se activa en respuesta a señales de factores de crecimiento a través de la vía PI3K/Akt. La estimulación de PI3K conduce a la activación de Akt mediante fosforilación. El pAkt es capaz de fosforilar el complejo hamartin-tuberin (TSC1-TSC2) y éste a su vez activará mTORC1.

La vía de señalización PI3K/Akt tiene diversas formas de regulación, pero la más importante es debida a la actividad del PTEN, gen supresor de tumores. PTEN antagoniza directamente la actividad de PI3K reduciendo la concentración de efectores post-PI3K dependientes del PI3K. En caso de mutación de PTEN, su función se pierde y la vía de señalización se hiperactiva (Guertin and Sabatini 2007), (Fig. 1.6).

Al contrario de lo que ocurre con el mTORC1, para el cual se conocen abundantes señales que influyen en su actividad, poco se conoce sobre los mecanismos que participan en la activación del mTORC2.

1.4.3- Componentes y regulación de la vía con posterioridad a mTOR (post-mTOR)

Mediante fosforilaciones, mTORC1 modula 2 vías de señalización diferentes que controlan la transcripción de un subgrupo específico de mRNAs incluyendo p70S6 (también conocida como S6K1 o proteína S6 quinasa) y 4EBP1 (inhibidor de eIF-4E). mTORC1 transmite señales de forma dependiente de la interacción con Raptor; aunque Raptor no es una quinasa, es requerido para la fosforilación de 4EBP1 y p70S6.

La fosforilación del inhibidor de traducción 4EBP1, reduce su actividad previniendo su unión a eIF4E, favoreciendo de esta manera que eIF4E se una a la estructura cap 5'-terminal del mRNA, reanudando así la traducción cap-dependiente (Wullschleger et al. 2006).

Por otra parte, mTOR fosforila y activa p70S6, activándolo, lo que provoca que sea capaz de fosforilar la subunidad ribosomal S6. Posteriormente, la subunidad 40S es reclutada en polisomas traduccionalmente activos; de este modo se aumenta la traducción de mRNAs, incluyendo los que codifican proteínas ribosomales, factores de elongación y factores de crecimiento de insulina (Faivre et al. 2006). La quinasa p70S6 controla varios procesos pro-crecimiento incluyendo procesos anti-apoptóticos.

Además de la bien caracterizada función en el incremento de síntesis de proteínas debida a la hiperactivación de 4EBP1 y p70S6, mTORC1 también estimula la biogénesis de ribosomas, inhibe la autofagia y potencia la síntesis de lípidos (Laplane and Sabatini 2009b) .

Se ha descrito que mTORC2 es el responsable de la activación completa de Akt por fosforilación en Ser308 y Ser473 (Sarbasov et al. 2005), además de controlar el citoesqueleto de actina (Sarbasov et al. 2004), aunque la vía de señalización que conduce a su activación no está bien caracterizada.

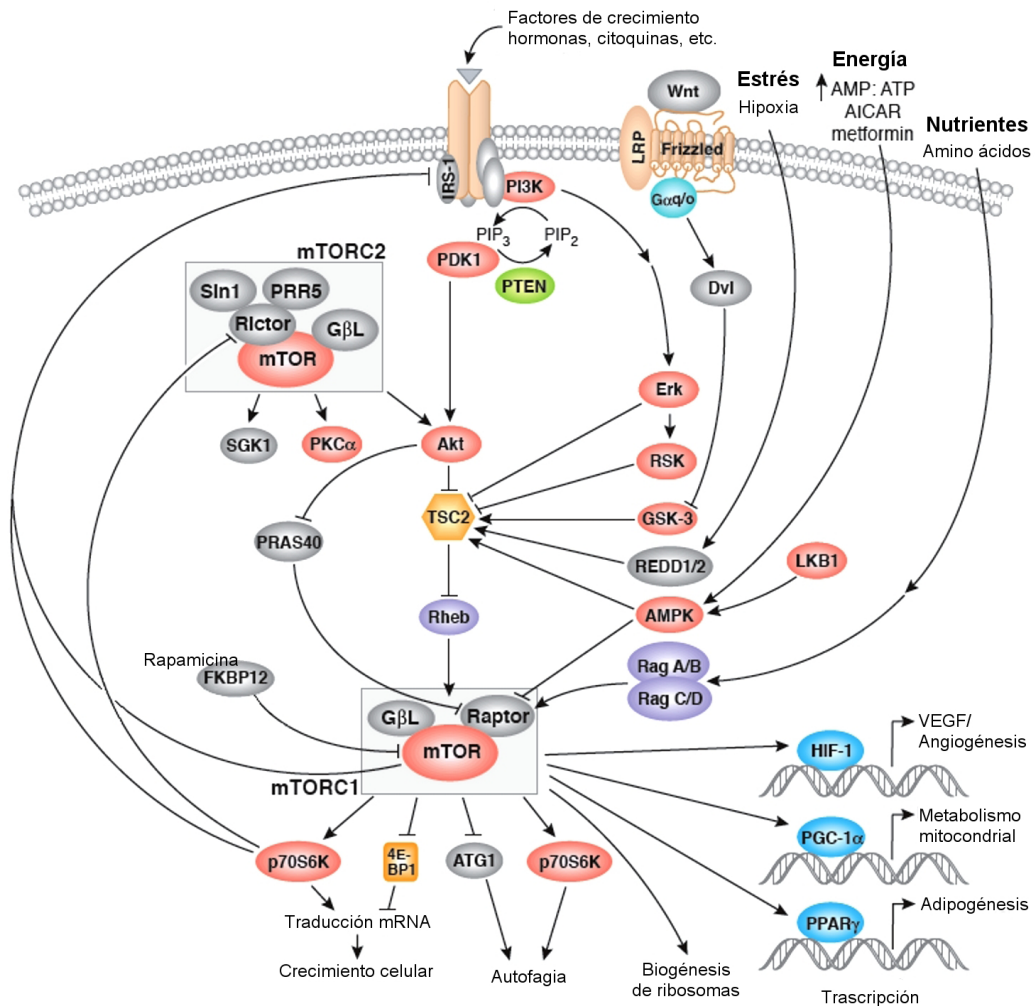


Fig. 1.6 Esquema de la vía de señalización del mTOR. Adaptada de www.cellsignaling.com.

1.5- Rapamicina

Como ha sido descrito anteriormente, la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR juega un papel importante en el desarrollo del tumor. Por esta razón, su inhibición ha sido considerada una estrategia atractiva para el tratamiento de diversos cánceres (Vivanco and Sawyers 2002).

La rapamicina, también conocida como sirolimus (AY-22,989), fue descubierta en un programa de búsqueda de nuevos agentes antifúngicos y recibe su nombre debido a que fue aislada de una muestra de tierra de la isla Rapa Nui (Sehgal et al. 1975). No mucho tiempo después, se reconoció su efecto inhibitorio del sistema inmune en ratas (Martel et al. 1977). Ambos efectos, el antifúngico y el inmunosupresor, resultan de la habilidad del fármaco de interrumpir la vía de mTOR, la cual está relativamente conservada desde levaduras hasta humanos (Vivanco and Sawyers 2002). Este fármaco fue evaluado por el NCI (Developmental Therapeutic Branch of the National Cancer Institute) e identificado como agente no-citotóxico pero con fuerte actividad citostática en diversos tumores humanos tanto in vitro como in vivo (Eng et al. 1984; Muthukkumar et al. 1995).

La rapamicina es una lactona macrocíclica producida por *Streptomyces hygroscopicus* (Singh et al. 1979) y es poco soluble en agua. Debido a su problema de solubilidad, se han diseñado análogos con modificaciones que mejoran esta y otras propiedades farmacocinéticas de la rapamicina, como la baja biodisponibilidad.

Introducción

Torisel (temsirolimus, CCI-779, inhibidor de ciclo celular), everolimus (RAD001) y deforolimus (Ridaforolimus, AP23573 o MK-8669) son análogos, estructuralmente similares a la rapamicina que difieren tan sólo en una posición del anillo lactona (C40), [la cual no está relacionada con el sitio de unión con el mTOR (Fig. 1.7)].

Torisel es un éster ácido, dihidroxi-metil-propinoico, soluble en agua y es el único en forma de pro-fármaco de rapamicina. Se encuentra disponible comercialmente para aplicación intravenosa u oral. Una vez administrado sufre rápidamente hidrólisis permitiendo la detección de rapamicina a los 15 minutos de la administración; y alcanzando picos de concentración entre 0.5 y 2 horas después de ser administrado.

Everolimus es un derivado oral no es un pro-fármaco y deforolimus está disponible tanto para su administración oral como intravenosa (Hartford and Ratain 2007).

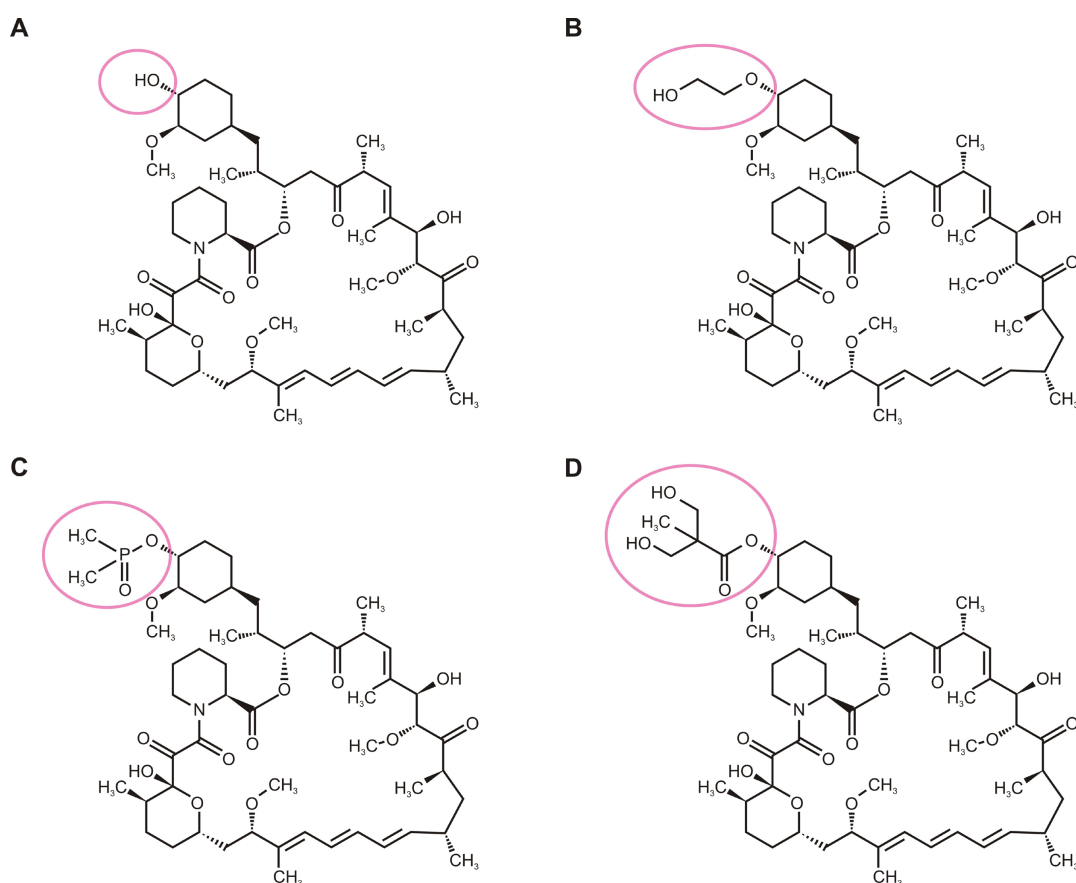


Fig. 1.7 Estructura química de los inhibidores de la vía de mTOR. (A) Rapamicina (sirolimus), (B) torisel (temsirolimus), (C) RAD001 (everolimus) y (D) AP23573 (deforolimus).

1.5.1- Mecanismo antitumoral de la rapamicina

En células tumorales con la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR activa, la rapamicina forma inicialmente un complejo con FKBP12 (12-kDa, FK506- proteína de unión). Este complejo se une a FRB (domino de unión de mTOR) e inhibe la actividad quinasa de mTORC1.

Bajo la interacción con FKBP12/rapamicina, el mTORC1 sufre cambios conformacionales. Estos cambios estructurales son los responsables del efecto de la rapamicina sobre p70S6 y 4E-BP1 (Fingar and Blenis 2004).

La rapamicina permite la fosforilación del inhibidor de traducción 4E-BP1, previniendo su unión a eIF4E; por otra parte, inhibe la fosforilación de la quinasa p70S6, inactivándola e impidiendo la subsiguiente fosforilación de la subunidad ribosomal S6. Todo ello provoca la inactivación de las señales de traducción pro-crecimiento.

El resultado de la actividad de la rapamicina es la supresión de la proliferación celular junto con la inhibición de la angiogénesis en diversos tumores humanos. Esto puede ser explicado debido al arresto del ciclo celular en G₁ y disminución de la expresión de VEGF. A nivel molecular, el efecto es provocado por la supresión, mediada por mTORC1/4EBP1, de la traducción de mRNAs sensibles a eIF4E como ciclina D1, ciclina D3, VEGF (Liu et al. 2009), y disminución de los niveles de MMP-2 y MMP-9 (Heimberger et al. 2005), (Fig. 1.8).

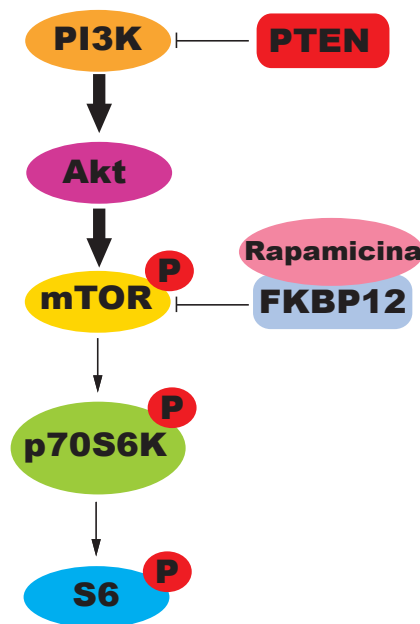


Fig. 1.8 Esquema de la vía de PI3K/Akt/mTOR con la actividad de la rapamicina. La mayoría de los GBM tienen alterado el gen PTEN, lo cual resulta en una actividad incrementada de la vía PI3K/Akt/mTOR. La proteína mTOR activa la p70S6K. La quinasa p70S6K fosforila la proteína ribosómica S6 de la subunidad ribosómica 40S en las serinas 235 y 236. La rapamicina se une a la proteína de unión FKBP12, tras lo cual el complejo rapamicina-FKBP12 se une a mTOR inhibiendo la vía. En esas condiciones, la quinasa p70S6K no puede fosforilar la proteína S6 de la subunidad ribosómica 40S, por lo que dicha subunidad no puede ser activada.

1.5.2- Ensayos clínicos

A lo largo de estos últimos años, se han realizado diversos ensayos clínicos en fase I y II empleando rapamicina (Cloughesy et al. 2008) y su análogo torisel (Chang et al. 2004; Chang et al. 2005; Galanis et al. 2005; Kuhn et al. 2007) para el tratamiento de GBM.

Introducción

Los ensayos en fase II que han utilizado análogos de rapamicina como monoterapia no han demostrado eficacia clínica. Aunque el objetivo principal de supervivencia libre de progresión de tumor no fuera alcanzado, una proporción de pacientes mostraron evidencias de mejoras radiográficas asociadas con prolongación del tiempo de progresión; la mayoría de los pacientes de este grupo mostró mejoras en el estado de los síntomas.

Es necesario recordar que la rapamicina puede ser efectiva principalmente en pacientes con tumores dependientes de la vía de mTOR. Esto sugiere la necesidad de la estratificación de pacientes para éste tratamiento de acuerdo con el estatus del regulador pre-mTOR, PTEN.

Actualmente se tiende a pensar que las terapias combinadas con dos o más fármacos pueden ser más efectivas que las monoterapias. Ya han sido propuestas varias terapias combinadas con rapamicina para el tratamiento de GBM, debido a que la rapamicina como medicamento único no alcanzó el nivel de eficiencia del 30% en supervivencia libre de progresión a 6 meses.

La rapamicina y sus análogos han sido evaluados en combinación con los inhibidores de EGFR, erlotinib (Reardon et al. 2010) y gefitinib (Kreisl et al. 2009b). En este momento existen varios ensayos clínicos activos que utilizan combinaciones con rapamicina y sus análogos: vandetanib y rapamicina; torisel y temozolomida; everolimus, temozolomida y radioterapia seguida del tratamiento suplementario con everolimus y temozolomida; sorafenib y torisel; y torisel y perifosina (<http://www.cancer.gov/clinicaltrials>).

1.6- Irinotecan (CPT-11)

El compuesto derivado de la camptotecina, CPT-11 (irinotecan), es un alcaloide extraído del árbol chino *Camptotheca acuminata*. La insolubilidad de la camptotecina obligó al desarrollo de análogos más solubles, entre los que se encuentran el topotecan y el CPT-11 (Slichenmyer et al. 1994). El topotecan presenta una desventaja a la hora de su uso en el tratamiento de tumores cerebrales, ya que es rápidamente hidrolizado a la forma inactiva, con el anillo abierto, lo que limita su biodisponibilidad.

El CPT-11 es el derivado de la camptotecina que mejor se solubiliza en agua. Mayoritariamente está en forma de pro-fármaco inactivo, susceptible de ser transformado por la enzima carboxilesterasa a SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina), compuesto 1000 veces más activo.

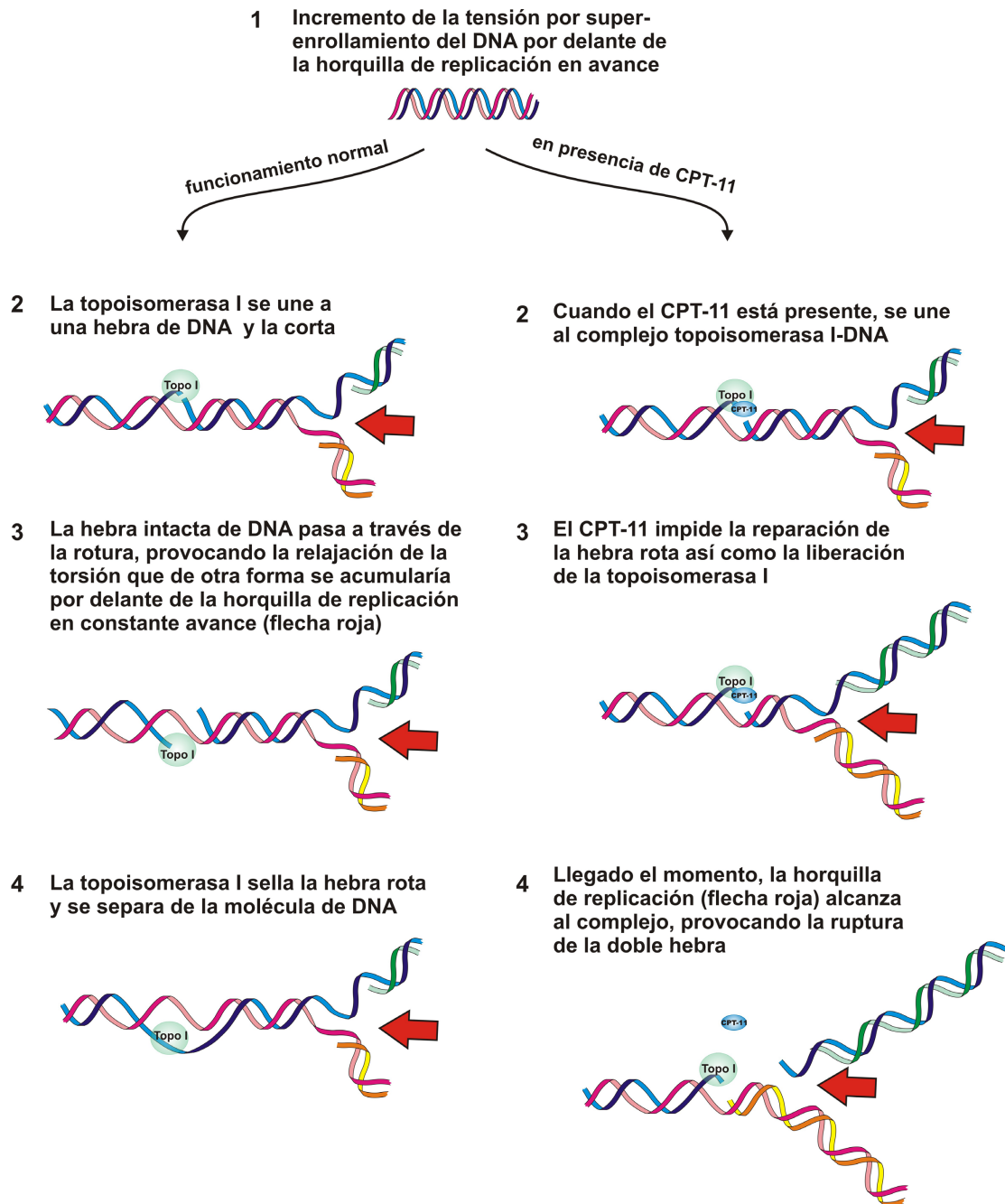


Fig. 1.9 Mecanismo de actuación de la topoisomerasa I y efecto del CPT-11 sobre ella. En el lado izquierdo se muestra el funcionamiento de la topoisomerasa I en condiciones fisiológicas. En el lado derecho se esquematiza el efecto del CPT-11 sobre la topoisomerasa I. La colisión de la horquilla de replicación con el complejo formado por CPT-11 resulta en una ruptura irreversible de la doble hélice del DNA.

Aunque el hígado es el sitio principal de bioactivación de CPT-11, se ha demostrado que las células de glioma son capaces de convertir CPT-11 en SN-38 directamente (Chen et al. 2003).

El mecanismo de acción de la camptotecina consiste en la inhibición de la topoisomerasa I, enzima nuclear esencial requerida para la relajación del DNA en conformación superhelicoidal, lo cual permite los cambios topológicos que facilitan la transcripción de RNA y la replicación de DNA (Singh et al. 2005). Las actividades de las topoisomerasas I y II están aumentadas significativamente en gliomas malignos. La actividad de CPT-11 provoca la liberación de la topo I causado por la ruptura de la hebra sencilla de DNA, (Fig. 1.9). Estas rupturas provocan el arresto del ciclo celular en la fase S/G2 e inducen la activación de vías apoptóticas, desencadenando la muerte celular. Consecuentemente, el CPT-11 sólo es letal si se encuentran en curso la replicación del DNA o la transcripción del RNA de la célula diana (Holm et al. 1989).

El CPT-11 ha demostrado actividad antitumoral en modelos animales de gliomas humanos tras su administración intraperitoneal (Hare et al. 1997), así como administrado intracranalmente encapsulado en nanoliposomas mediante CED (Noble et al. 2006).

Se han llevado a cabo diversos ensayos clínicos en fase I y II, administrando CPT-11 intravenoso como monoterapia en pacientes adultos con gliomas malignos recurrentes (Friedman et al. 1999; Cloughesy et al. 2002; Gilbert et al. 2003; Raymond et al. 2003; Batchelor et al. 2004; Prados et al. 2004; Prados et al. 2006; Santisteban et al. 2009). Estos ensayos demostraron una limitada actividad clínica como monoterapia pero en combinación con otros fármacos, particularmente con temozolomida (Gruber and Buster 2004; Reardon et al. 2005; Loghin et al. 2007; Quinn et al. 2009) y bevacizumab (Vredenburgh et al. 2007a; Vredenburgh et al. 2007b; Friedman et al. 2009; Kreisl et al. 2009a; Xu et al. 2010), han producido resultados esperanzadores con toxicidades tolerables por el organismo.

Objetivos

El objetivo principal de este estudio ha sido la búsqueda de posibles mejoras en el tratamiento del glioblastoma empleando el fármaco rapamicina; para conseguirlo se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1- Estudio del efecto de diferentes dosis de rapamicina en la proliferación celular, tanto in vitro como in vivo.

2- Búsqueda del marcador adecuado que permite cuantificar a lo largo del tiempo la actividad de la rapamicina, in vitro e in vivo.

Objetivos

3- Análisis de distintos calendarios de administración del fármaco para incrementar la efectividad del mismo.

4- Comparación de la efectividad de la rapamicina y de su análogo, torisel, tanto in vitro como in vivo.

5- Búsqueda del método de administración del fármaco que maximice su eficacia y reduzca la toxicidad en modelos de animales xenotransplantados con células de GBM humano.

6- Estudio del efecto ejercido por la rapamicina sobre células troncales tumorales derivadas de GBMs humanos y comparación con los resultados obtenidos en líneas establecidas tanto in vitro como in vivo.

7- Evaluación de la actividad terapéutica de la rapamicina en combinación con el agente antitumoral CPT-11 in vitro e in vivo.

Materiales y métodos

3.1- Fármacos

3.1.1- Experimentos realizados in vitro

La **rapamicina** se obtuvo de LC Laboratories y el **torisel** de Wyeth Pharmaceuticals (actualmente Pfizer). Ambos se prepararon en etanol absoluto (Fischer Scientific). Las concentraciones utilizadas por ambos fármacos fueron 2,5; 5; 10; 25; 75; 125; 250; 500 y 1000 ng/ml.

Se utilizó **CPT-11** encapsulado en nanoliposomas, nLs-CPT-11 (Bioscience). Los liposomas fueron disueltos en PBS. Las concentraciones de nLs-CPT-11 utilizadas fueron 5; 10; 20; 40 y 100 µg/ml.

3.1.2- Experimentos realizados in vivo

La rapamicina (LC Laboratories) se disolvió en Tween 80/ PEG 400/ DMA (vehículo) para su administración intraperitoneal. El torisel (Wyeth Pharmaceuticals), se preparó siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las concentraciones empleadas para este tipo de administración fueron 10 y 25 mg/kg en ambos casos. Para su administración intracraneal, ambos fármacos se disolvieron en etanol absoluto. Se prepararon stocks de 500; 100; 50; 10; 1; 0,5; 0,1 y 0,05 µg/ml con los que se administraron dosis de: 10; 2; 1; 0,2; 0,02; 0,01; 0,002 y 0,001 µg/rata respectivamente.

Los **nLs-CPT-11** (Bioscience) disueltas en PBS. Se utilizaron para su administración intracraneal a 20 mg/ml (0,4 mg/rata) y 40 mg/ml (0,8 mg/rata).

M & M

3.2- Líneas celulares

Las líneas celulares establecidas de glioblastoma multiforme (GBM) **U87MG** y **U251MG** se obtuvieron del Brain Tumor Research Center Tissue Bank en la Universidad de California, San Francisco. Las células se mantuvieron como una monocapa en un medio mínimo esencial Eagle's complementado con 10% de suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales, 0,1 mg/ml de sulfato de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina G. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada consistente en 95% de aire y 5% de CO₂.

Las células troncales tumorales (CSCs) derivadas de resecciones quirúrgicas de GBM humano, denominadas CSCs-5 y CSCs-7, fueron amablemente suministradas por Jon Gil (CBMSO). Fueron mantenidas como cultivos de neuroesferas en suspensión en medio de cultivo químicamente definido compuesto por DMEM:F12 (1:1) complementado con glutamax (Gibco), 0,5% Albumax I (Gibco), 5 mM Hepes (Gibco), 0,915% Glucosa (Sigma), N2 1x (Invitrogen), 2 µg/ml heparin (Sigma), 20 ng/ml EGF y FGF-2 (Peprotech), aminoácidos (L-Ala 44 mM, L-Asn 45 mM, L-Asp 40 mM, L-Glu 40 mM, L-Pro 30 mM) y gentamicina (0,055 mg/ml). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 97% de humedad, conteniendo un 5% CO₂.

3.3- Experimentos in vitro

3.3.1- Ensayo de viabilidad celular

Se cultivaron 4000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (Corning Inc.). Veinticuatro horas después, las células fueron expuestas al correspondiente fármaco a diferentes concentraciones en medio completo. La mezcla de tampón Cell-titer-Glo y el sustrato Cell-titer-Glo (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega), se añadió 24, 48, ó 72 horas después del inicio del tratamiento. La luminiscencia de cada pocillo fue medida con un luminómetro FLx800 Multi-Detection Microplate Reader (Biotek). La luminiscencia de fondo fue determinada mediante la incubación de medio sólo y restando dicho valor a los otros valores. Las fracciones de células supervivientes se dedujeron de la extrapolación gráfica empleando el programa Gen 5 Data Analysis Software, (Biotek).

M & M

3.3.2- Inmunocitoquímica

Para visualizar la inhibición de mTOR en las células U87MG y U251MG, mediante tinción inmunocitoquímica y empleo del anticuerpo “Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236)” (dilución 1:100; Cell Signaling Technology), las células se cultivaron en una cámara de dos pocillos. Después de 24 horas de incubación, se expusieron a las diferentes concentraciones de los fármacos en medio completo. Después de 24, 48 ó 72 horas de incubación, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Posteriormente, la actividad de la peroxidasa endógena fue anulada con 0,5% H_2O_2 en metanol. Las células fueron sumergidas en una disolución de bloqueo (2% suero normal de cabra, 0,01% Triton-X y 0,01% Tween 20 en PBS) durante 20 minutos. Se incubó el anticuerpo primario, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se incubó el anticuerpo secundario (Dako En Vision+ Dual Link System Peroxidasa; Dako) durante 2 horas a temperatura ambiente. La señal se reveló con el kit Dako AEC + High Sensitivity Substrate Chromogen; (Dako) durante 10 minutos. Por último se aplicó la contratinción con hematoxilina Mayer’s, Lillie’s Modification; (Dako) durante 30 segundos. Las preparaciones fueron analizadas con un microscopio Zeiss Imager Z1. Se utilizó una cámara acoplada con apertura fija para captar las imágenes.

3.3.3- Medición de la proteína pS6 mediante ELISA

Un día antes del tratamiento, se sembraron 2×10^5 células U87MG o U251MG por pocillo en una placa de 6 pocillos (Corning Inc.). Las células fueron expuestas a diferentes fármacos y concentraciones en medio completo. Después de 24, 48 ó 72 horas de incubación, las células fueron lisadas (tampón de lisis de Cell Signaling Technology), los extractos fueron centrifugados (1100 rpm, 15 min, 5°C) y se recogieron los sobrenadantes. La cantidad de proteína pS6 fue cuantificada usando el kit pS6 ELISA

(del inglés: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Pathscan Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser 235/236) Sandwich ELISA Kit; (Cell Signaling Technology). Se añadieron 75 µl de "Sample Diluent" al mismo volumen de células lisadas y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Después de cuatro lavados con "Wash Buffer", las células lisadas fueron incubadas con 100 µl de "Detection Antibody" durante 1 hora a 37°C. Se repitieron los lavados y después se incubaron las células con 100 µl del anticuerpo secundario "HRP-linked" durante 30 minutos a 37°C. Una vez lavadas cuatro veces, las células lisadas fueron incubadas con 100 µl de "TMB Substrate" durante 10 minutos a 37°C. La reacción se paró con 100 µl de "STOP Solution". Las placas se midieron a 450 nm con un lector ELx808 Multi-Detection Microplate Reader (Biotek). Los valores fueron calculados automáticamente por el programa Gen 5 Data Analysis (Biotek).

3.3.4- Extracción de proteínas para western blot

Un día antes del tratamiento, se sembraron 1×10^5 células U87MG ó U251MG por pocillo en una placa de 6 pocillos (Corning Inc.). Se expusieron las células a los diferentes fármacos y concentraciones en medio completo. Después de 24, 48 ó 72 horas de incubación, las células fueron lisadas y los extractos de proteínas se almacenaron a -20°C hasta su uso. En el caso de las CSCs, se sembraron 10^5 células CSCs/ml con el tratamiento. Después de 3 ó 6 días de incubación, las células fueron lisadas y se recogieron los extractos. El tampón de lisis utilizado fue: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 0,5% SDS, 1 % Tritón X-100 y 10 mM PMSF. En todos los casos la concentración de proteína fue medida por *Dc protein assay* (BioRad).

M & M

3.3.5- Western blot

Las proteínas (20 µg) fueron separadas en gel SDS-PAGE al 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Whatman). Las membranas fueron bloqueadas con 5 % leche desnatada en polvo y 0,3% tween-20 (Merck) durante 1 hora a temperatura ambiente e incubadas con los siguientes anticuerpos a sus correspondientes tiempos de incubación (Tabla 3.1): anti-pS6, anti-S6, anti-pAkt, anti-Akt. Tras 4 lavados con PBS + 0,3% tween-20, se incubaron los anticuerpos secundarios apropiados conjugados a peroxidasa y la reacción se reveló por quimioluminiscencia.

3.3.6- Citometría de flujo

En todos los experimentos se analizaron al menos 10.000 eventos por muestra en el citómetro FACSCalibur (BD Bioscience). Todos los eventos fueron preseleccionados en base a su tamaño y complejidad (parámetros FSC y SSC) para descartar restos o partículas contaminantes. El programa utilizado para evaluar los resultados fue FlowJo (Tree Star).

Tabla 3.1. Anticuerpos usados en este estudio

Anticuerpo	Tipo	Disolución	Incubación	Empresa	Referencia	Aplicación
Actina	pAc	1:1000	1 h RT	Sigma	A2066	WB
Akt	mAc	1:1000	o.n. 4°C	Cell signaling	9272	WB
pAkt Ser473	mAc	1:1000	o.n. 4°C	Cell signaling	9271	WB
Ig-HRP de ratón	pAc	1:3000	1 h RT	DAKO	P0161	WB
Ig-HRP de conejo	pAc	1:3000	1 h RT	DAKO	P0448	WB
S6	mAc	1:5000	1 h RT	Cell signaling	2271	WB
pS6 Ser235/236	pAc		2 h 37°C	Cell signaling	7205	E
pS6 Ser235/236	mAc	1:100	o.n. 4°C	Cell signaling	4858	IC/ IHC
pS6 Ser235/236	pAc	1:3000	1 h RT	Cell signaling	2211	WB
Tubulina	mAc	1:5000	1 h RT	Sigma	T9026	WB

Acrónimos utilizados en la tabla (pAc- anticuerpo policlonal; mAc- anticuerpo monoclonal; RT- temperatura ambiente (del inglés: room temperature); o.n.- toda la noche (del inglés: overnight); WB- western blot; IC- inmunquímica; IHC- inmunohistoquímica).

- **Expresión de CD133:** la expresión de CD133 fue analizada en CSCs utilizando el anticuerpo CD133/2-APC (Miltenyi Biotech) siguiendo las instrucciones de la compañía. Las células fueron resuspendidas en PBS/ 0,5% BSA/ 2mM EDTA. Se añadió Anti-CD133 (5 μ l para 1×10^6 células) a las muestras que fueron incubadas durante 15 minutos a 4°C. Para los controles se añadieron 10 μ l para 1×10^6 células de IgG2b-APC (Immunostep). Las muestras fueron incubadas durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Todas las muestras fueron lavadas dos veces. Se usó el láser de 488 nm y se recogió la emisión a 661/16 (FL4).

- **Análisis del ciclo celular:** Se utilizó la tinción con yoduro de propidio (IP) para el análisis de fase del ciclo celular (G1, S y G2) y el DNA fragmentado (subG0/ G1). Las células fueron recogidas y fijadas en etanol al 70% a -80°C durante 24 horas. Seguidamente fueron centrifugadas durante 5 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente y lavadas con PBS complementado con 1% de BSA (Sigma). Las células fueron a continuación resuspendidas en tampón de tinción de DNA [PBS, 1% BSA, 0,375 mg/ml RNasa A (Invitrogen) y 25 μ g/ml IP (Sigma)], e incubadas durante una hora a temperatura ambiente y oscuridad. Las células se conservaron en hielo y se analizaron inmediatamente. Se utilizó el láser de 488 nm y se recogió una emisión a 585/42 nm (FL2) para IP. Se elaboró un histograma representando la intensidad de fluorescencia (FL2-W) de cada evento. La distribución del ciclo celular se cuantificó determinando el porcentaje de células con una cantidad de DNA menor de 2n (subG0/G1), igual a 2n (fase G1), igual a 4n (fase G2) y variable entre 2n y 4n (fase S).

3.3.7- Ensayo de agar blando

Con el objetivo de evaluar el potencial tumorigénico de las dos líneas de CSCs tras el tratamiento con rapamicina, se sembraron 20.000 y 10.000 células viables de las líneas CSCs-5 y CSCs-7 respectivamente, por pocillo M6 en agar al 0,35% (BD Falcon). Brevemente, la capa base se obtuvo de la mezcla de volúmenes iguales de 1% de agar estéril, enfriado a 40°C, y medio 2x CSC, para obtener una disolución final de agar al 0,5% en medio 1x CSC. Para la capa superior, el agar fue disuelto al 0,7% en agua destilada, enfriado a 40°C y luego mezclado a partes iguales con medio 2x CSC. Inmediatamente, las células fueron añadidas a la mezcla dando lugar a una disolución final de 0,35% de agar en medio 1x CSC con 10.000 ó 5.000 células/ml. Las células crecieron durante 14 días a 37°C en una atmósfera humidificada conteniendo 5% CO₂. Se tiñeron las colonias viables con 1 ml/pocillo de 600 mg/ml MTT (del inglés Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma). Las colonias viables fueron fotografiadas y contadas mediante el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

M & M

3.4- Experimentos in vivo

3.4.1- Animales

Una cantidad total de 275 ratas fueron usadas a lo largo de este estudio: 241 ratas inmunodeficientes y 34 Sprague-Dawley. En los estudios de supervivencia, los inmunohistoquímicos y mediante ELISA, se utilizaron ratas macho, atímicas, inmunodeficientes, (rnu/rnu; 150–200 g, entre 5-8 semanas de edad). Las ratas fueron compradas al National Cancer Institute Animal Production Program (Frederick, MD, USA) o a Harlan Ibérica (Barcelona).

Para los estudios de toxicidad en el cerebro se usaron ratas macho sanas Sprague-Dawley con pesos en torno a 250 g (Charles-River Laboratories, Wilmington, MA).

Todos los animales estuvieron bajo condiciones asépticas, incluyendo aire filtrado, y comida, agua, y jaulas esterilizadas. Toda la metodología utilizada en los estudios con animales fue aprobada por la Universidad de California, San Francisco, Institutional Animal Care and Use Committee o siguieron el Real Decreto Español 1201/2005 BOE.

3.4.2- Implantación de tumores intracraneales

Las células fueron recogidas mediante tripsinización, lavadas una vez con PBS con Ca²⁺ y Mg²⁺ (D-PBS, CMF) y resuspendidas en D-PBS para su implantación en el estriado. Se emplearon 3x10⁵ células U87MG ó 5x10⁵ células CSCs-5 en 10 µl de D-PBS. Las ratas se mantuvieron anestesiadas con isoflurano y fueron colocadas en un pequeño soporte estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, Calif.). Se realizó una incisión sagital en la piel para exponer el cráneo, y se empleó un pequeño torno

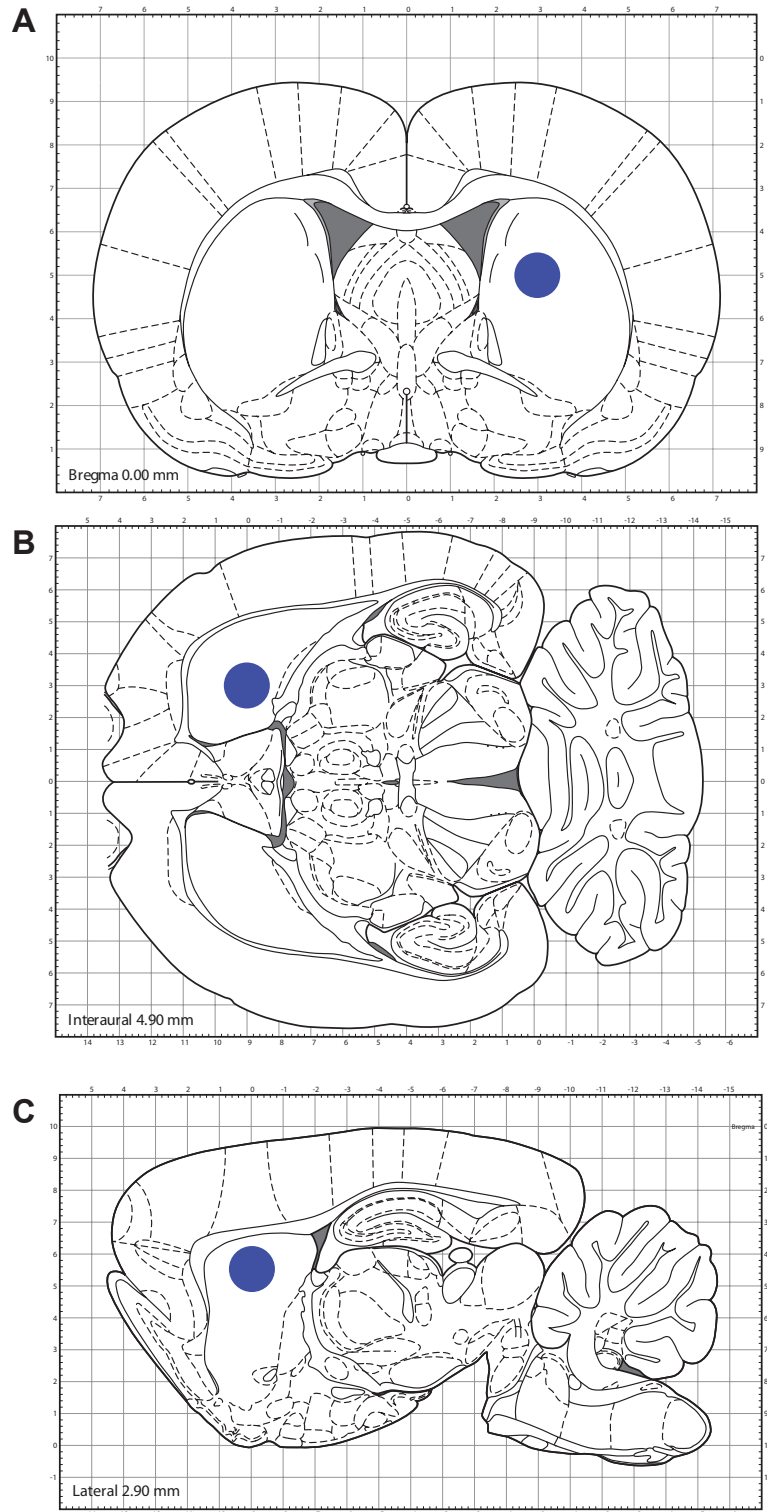


Fig. 3.1 Localización del implante intracraneal del tumor. Las células se implantaron 3 mm a la derecha respecto de bregma, a una profundidad de 5 y 4.5 mm. El punto azul señala el lugar de implantación del tumor. (A- sección coronal; B sección axial y C- sección sagital). Modificada a partir de (Paxinos and Watson 2007).

de dentista para taladrar un agujero en el cráneo 3 mm a la derecha de bregma. Se inyectaron 5 μ l de la suspensión celular de U87MG a una profundidad de 5 mm desde la superficie del cerebro. Después de 2 min, se inyectaron otros 5 μ l a una profundidad de 4,5 mm (Fig. 3.1) . En el caso de las células CSCs-5, se inyectaron 10 μ l de la suspensión celular a una profundidad de 4 mm. Después de un intervalo de 2 min, se retiró la aguja y la herida fue cerrada mediante sutura.

3.4.3- Administración potenciada por convección (CED, del inglés: Convection-Enhanced Delivery)

A lo largo de este estudio, los nLsCPT-11, la rapamicina, el torisel o los vehículos fueron administrados, en un volumen de 20 μ l, mediante CED como se ha mencionado previamente en la introducción (Bankiewicz et al. 2000; Saito et al. 2004). El sistema consistió en una cánula de sílice conectada a una jeringuilla de 100 μ l, montada en una bomba de microinstilación (BeeHive; Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA) que regula el flujo del fluido a través del sistema. Siguiendo las coordenadas en donde fue implantado el tumor, se monta la cánula de sílice con diseño escalonado, que no presenta reflujo (Krauze et al. 2005), en el soporte estereotáxico y se introduce en la región diana (5 mm de profundidad) en el cerebro a través del agujero taladrado en el cráneo como se describió previamente. Se aplicó una inyección a una velocidad controlada de 0,5 μ l/min durante 40 min introduciendo un volumen total de 20 μ l (Fig. 3.2).

M & M

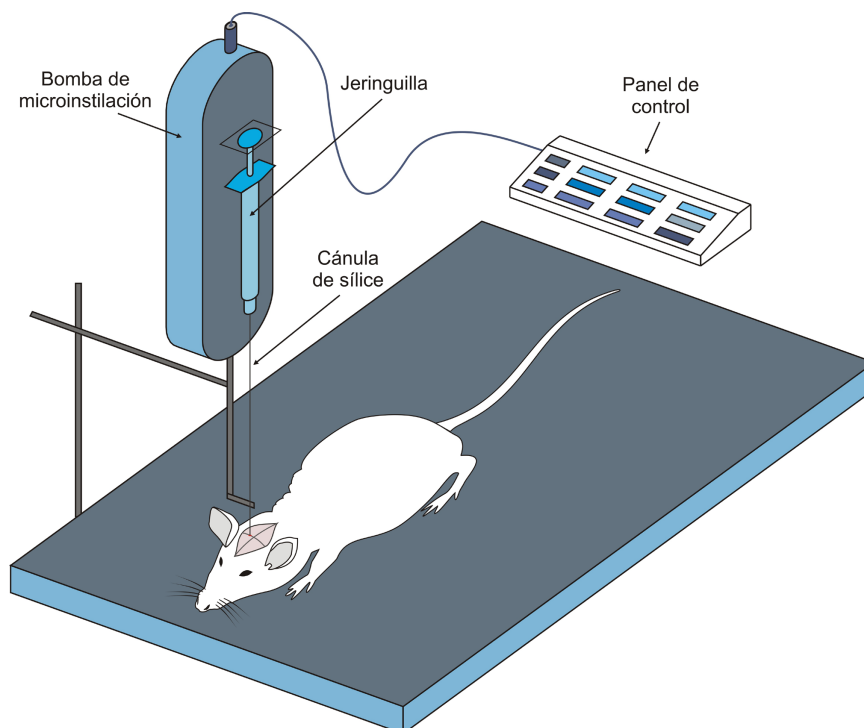


Fig. 3.2 Esquema de la administración potenciada por convección (CED). La cánula de sílice se conecta a una jeringuilla de 100- μ l y se monta en una bomba de microinstilación que regula el flujo del fluido a través del sistema. Siguiendo las coordenadas del lugar donde se implantó el tumor, la cánula se monta y se introduce hasta la zona diana en el cerebro a través de agujeros taladrados en el cráneo.

3.4.4- Bomba osmótica

Se emplearon bombas osmóticas para la administración intracraneal de rapamicina ($1\mu\text{g/ml}$). El modelo empleado posee un depósito de 2 ml y proporciona un flujo constante de $10\ \mu\text{l/h}$ durante 7 días (2ML1, Alzet). La bomba fue implantada de forma subcutánea, por lo que se realizó una incisión escapular en la piel para crear una cavidad en la que alojar la bomba. Esta se conecta con un catéter de vinilo a la cánula que llega a la región diana en el centro del tumor. La bomba funciona gracias a la diferencia de presión osmótica entre el interior de la bomba y y el tejido circundante. Esta diferencia provoca la entrada de agua dentro de la bomba a través de una membrana semipermeable situada en la superficie externa de la bomba. Conforme el agua penetra, comprime el reservorio flexible, desplazando la rapamicina desde la bomba hacia el área diana. La bomba fue retirada al cabo de 1 semana (Fig. 3.3).

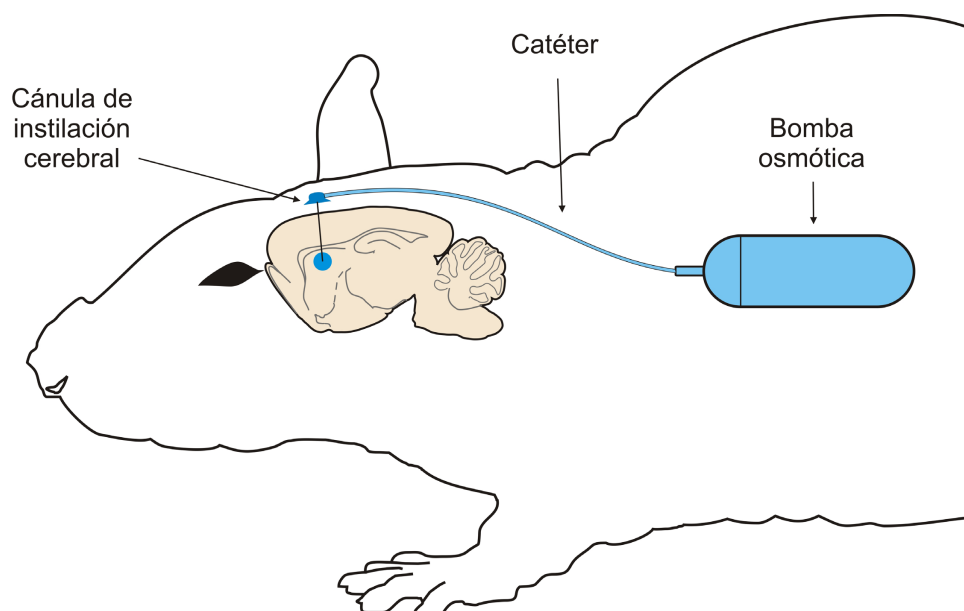


Fig. 3.3 Esquema de bomba osmótica. La bomba se implanta de forma subcutánea y se conecta con un catéter de vinilo a la cánula que se introduce en el centro del tumor.

3.4.5- Tratamiento mediante inyección intraperitoneal (i.p.)

La rapamicina y el torisel fueron administrados intraperitonealmente a diferentes concentraciones y calendarios de administración comenzando 7 días después de la implantación de las células U87MG y 28 días en el caso de las CSCs-5. Los calendarios de administración utilizados fueron: rapamicina a $10\ \text{mg/kg}$ una vez por semana, rapamicina a $25\ \text{mg/kg}$ una vez por semana, rapamicina a $10\ \text{mg/kg}$ cada 5 días, rapamicina a $10\ \text{mg/kg}$ los días 7, 8, 9, 15, 16, 17 después de la implantación de las células (grupo de ciclo, 6 días en total), torisel a $25\ \text{mg/kg}$ una vez por semana y torisel a $10\ \text{mg/kg}$ los días 7, 8, 9, 15, 16, 17 (grupo de ciclo, 6 días en total).

3.4.6- Imágenes de resonancia magnética (MRI, del inglés Magnetic Resonance Imaging)

Los análisis fueron realizados en un escáner Biospec BMT 47/40 (Bruker Ettlingen, Germany) funcionando a 4,7 Teslas, equipado con un sistema de gradiente apantallado de 12 cm de diámetro. Para todos los animales se obtuvieron las imágenes axiales de 1 mm de grosor potenciados en T1 con gadolinio (0,7-1 ml/animal). En estas condiciones los tumores aparecen hiperintensos en las imágenes. Las áreas del contorno del tumor fueron determinadas manualmente mediante el software ParaVision (Bruker) y sumado para obtener el volumen.

3.4.7- Evaluación de la toxicidad sistémica

Se realizó un seguimiento de las ratas dos veces al día para evaluar la salud general (capacidad de alerta, alimentación, excrementos, la piel, el pelo, las membranas mucosas, respiración, y postura). Los pesos de los animales fueron registrados dos veces por semana. El nLs-CPT-11 fue utilizado a una dosis subtóxica determinada previamente ([Noble et al. 2006](#)).

M & M

3.4.8- Evaluación de la toxicidad en el cerebro

En los estudios de supervivencia, se realizaron análisis histopatológicos de los tejidos cerebrales en todos los animales que mostraron evidencias clínicas de progresión del tumor, así como en los animales supervivientes. Para el estudio de toxicidad de la CED con rapamicina y torisel, el hemisferio derecho fue utilizado para evaluar la toxicidad del medicamento y el izquierdo para la toxicidad del vehículo. Cada concentración del fármaco tiene de este modo su propio control que consiste en la administración de la misma cantidad de etanol.

Los animales fueron perfundidos con PBS y 4% PFA. Tras la fijación a lo largo de una noche (4% PFA), los cerebros fueron procesados. Se obtuvieron secciones de 40 µm cortadas con un microtomo rotacional que se almacenaron en sacarosa al 30%. Las secciones fueron rehidratadas con lavados secuenciales de etanol al 95% (2 minutos) y etanol al 70% (2 minutos). A continuación fueron teñidas con hematoxilina durante 15 segundos, diferenciadas en ácido acético glacial 0,5% y alcohol 70% (20 inmersiones) y teñidas con eosina (17 segundos). Las secciones fueron entonces lavadas con etanol al 95% 3 veces (2 minutos cada una) y secadas con xileno 2 veces (2 minutos cada una). Los tejidos se analizaron con un microscopio Zeiss Imager Z1 con una cámara acoplada.

3.4.9- Immunohistoquímica

Se implantaron tumores U87MG en 54 ratas: 2 controles para el tratamiento i.p., 2 controles para el tratamiento mediante CED, 10 animales tratados con rapamicina a 10 mg/kg (i.p.), 10 animales tratados con rapamicina a 25 mg/kg (i.p.), 10 animales tratados con torisel a 25 mg/kg (i.p.), 10 animales tratados mediante CED de rapamicina y 10 animales tratados mediante CED de torisel. A los 7 días, los animales recibieron el tratamiento indicado. Los animales fueron sacrificados 1, 2, 3, 4 ó 5 días después del tratamiento y perfundidos con PBS y 4% PFA. Después de una fijación durante una noche (4% PFA), los cerebros fueron procesados en bloques de parafina. Se cortaron secciones de 5 µm en un microtomo rotatorio. Las secciones embebidas en parafina fueron deparafinizadas con xileno (3 lavados de 5 minutos cada uno) e hidratadas con lavados de etanol (3 al 100%, 1 al 95 %, 1 al 70 %; de 2 minutos cada uno). Se pusieron entonces al baño maría en Diva Decloaker, (1:10, Biocare Medical) para el desenmascaramiento de los antígenos. Fueron bloqueados en PeroxAbolish (Biocare Medical, 15 minutos) y Biocare Medical Sniper (10 minutos). Las láminas fueron incubadas durante una noche con anticuerpo monoclonal de conejo anti-Phospho-S6-Ribosomal-Protein (Ser 235/236) (1:100 en disolvente Da Vinci; Cell Signaling Technology). Después de 4 lavados y una incubación con Dako En Vision Dual link System HRP (Dako) (2 horas), se utilizó la tinción con Dako AEC + High sensitivity substrate chromogen (Dako) (20 minutos). Las láminas fueron contrastadas con hematoxilina (Dako) durante 1 minuto y montadas con líquido de montaje acuoso. Los tejidos fueron observados con un microscopio Zeiss Imager Z1 y una cámara acoplada con una apertura fija para la captura de imágenes. Los anticuerpos utilizados se especifican en la [Tabla 3.1](#).

M & M

3.4.10- Preparación de extractos de proteína in vivo para la cuantificación de pS6 mediante ELISA

Se implantaron tumores U87MG en 54 ratas: 2 controles para el tratamiento i.p., 2 controles para el tratamiento mediante CED, 10 para rapamicina con 10 mg/kg (i.p.), 10 para rapamicina a 25 mg/kg (i.p.), 10 para torisel a 25 mg/kg (i.p.), 10 para CED de rapamicina y 10 para CED de torisel. Las ratas recibieron el tratamiento siete días después de la implantación del tumor. Los animales fueron sacrificados 1, 2, 3, 4 ó 5 días después del tratamiento y se extrajeron los tumores y fueron almacenados en nitrógeno líquido. Tras descongelar y homogenizar el tejido mediante sonicación, las proteínas fueron extraídas utilizando un tampón de lisis de Cell Signaling Technology. Se procedió a la realización del ELISA para la proteína pS6 de la forma anteriormente descrita.

3.4.11- Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos in vitro se analizaron estadísticamente mediante el test “t” de Student. La significancia estadística entre grupos fue evaluada mediante el valor “p”.

Los resultados de los estudios de supervivencia se han expresado mediante gráficas Kaplan-Meier. La supervivencia entre diferente grupos de tratamiento fue comparada estadísticamente mediante el log-rank test.

Resultados

4.1. Análisis del efecto de la rapamicina y el torisel a diferentes concentraciones en modelos de GBM in vitro e in vivo.

La rapamicina y su análogo torisel tienen capacidad antitumoral contra una variedad de tumores, entre los que se incluye el glioblastoma. Hasta la fecha se han presentado numerosos resultados y han sido propuestos distintos tratamientos (Eshleman et al. 2002). La evaluación clínica de dichos tratamientos indica una baja eficacia (Galanis et al. 2005; Chang et al. 2005). Hemos examinado la actividad de la rapamicina y el torisel en modelos de GBM con el objetivo de optimizar el tratamiento y establecer las dosis y el calendario de administración de mayor efecto terapéutico in vitro y en modelos de xenotransplantes ortotópicos.

4.1.1. Efecto citostático de la rapamicina y el torisel in vitro

Se ha realizado un experimento para medir la citotoxicidad, a diferentes concentraciones de rapamicina y torisel, a lo largo del tiempo: 24, 48 y 72 horas. El porcentaje de células supervivientes después de la administración de los fármacos a los distintos tiempos de exposición se muestra en las figuras (Fig. 4.1.A, 4.1.B, 4.1.C y 4.1.D). El etanol, utilizado como vehículo de la rapamicina y el torisel, no parece causar ningún efecto citotóxico en las líneas celulares U87MG y U251MG a las concentraciones utilizadas (Fig. 4.1.A, 4.1.B, 4.1.C y 4.1.D).

Resultados

Cuando comparamos las gráficas obtenidas a distintas concentraciones de rapamicina o torisel, observamos que son prácticamente idénticas independientemente del tiempo, lo cual sugiere que no existe una diferencia en el potencial citotóxico entre las distintas concentraciones.

La administración de rapamicina y torisel no genera un efecto citotóxico en ninguna de las dos líneas celulares; pero, en cambio, sí presenta un efecto citostático. Cuando se añadió rapamicina a las células U87MG, los niveles de ATP, empleados como medida de la viabilidad celular, fueron menores que para el control y el vehículo. A las 24 horas de exposición, la luminiscencia registrada fue de $1 \cdot 10^6$ RLU (del inglés: Relative Luminescence Units) para el control y el vehículo y $9,7 \cdot 10^5$ para las dos concentraciones de rapamicina (2,5 y 1000 ng/ml). A las 48 y 72 horas la expresión de ATP se incrementa en todos los casos debido a la división celular, pero se puede apreciar una diferencia entre las células tratadas y no tratadas. Los valores más bajos se obtuvieron con las células tratadas $1,2 \cdot 10^6$, mientras que las no tratadas dieron RLU de $1,5 \cdot 10^6$ a las 48 horas y $1,6 \cdot 10^6$ a las 72 horas debido al crecimiento progresivo (Fig. 4.1.A).

Los resultados fueron diferentes cuando la rapamicina se añadió a la línea celular de GBM humano U251MG. Las U251MG tratadas fueron capaces de duplicar la expresión de ATP entre las 24 y 72 horas (de $2,7 \cdot 10^6$ a $5,4 \cdot 10^6$ para 2,5 ng/ml y de $2,5 \cdot 10^6$ a $5,2 \cdot 10^6$ para 1000 ng/ml). La diferencia entre tratadas y no tratadas resulta más notable a las 72 horas de la administración del fármaco (Fig. 4.1.C).

El torisel muestra resultados muy similares a los obtenidos con la rapamicina.

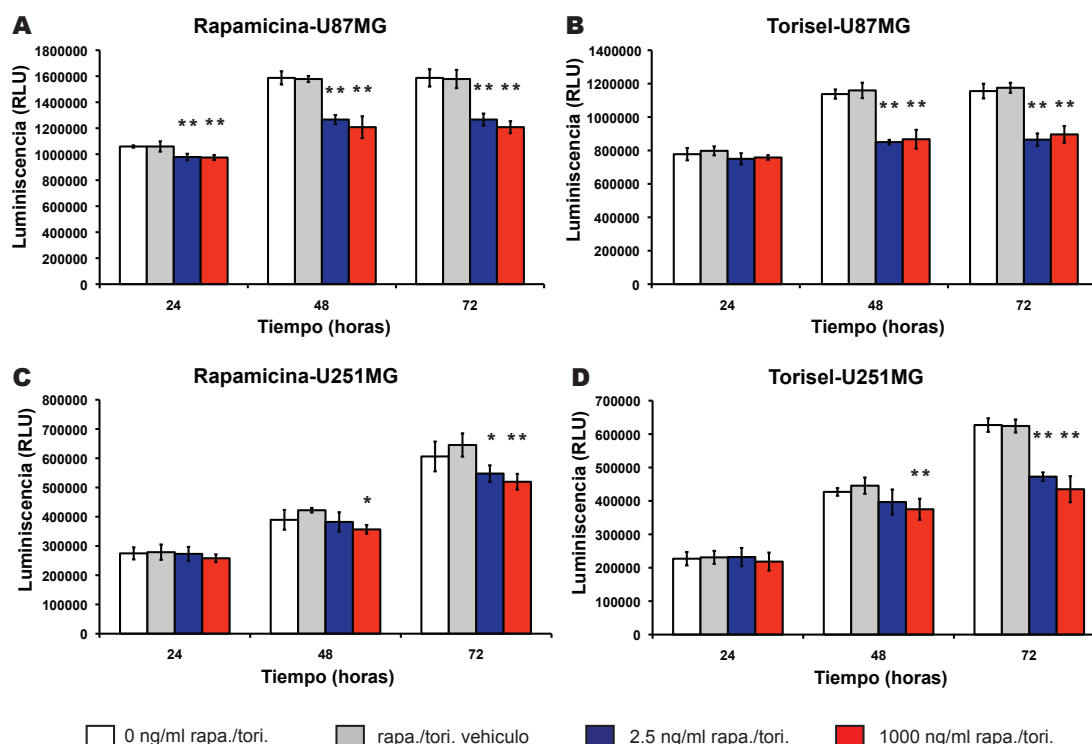


Fig. 4.1 Detección de ATP a diferentes tiempos de incubación y distintas concentraciones de los fármacos. (A) Células U87MG incubadas durante 24, 48 y 72 horas con concentraciones de rapamicina 0 ng/ml; vehículo; 2,5 ó 1000 ng/ml. (B) Células U87MG incubadas durante 24, 48 y 72 horas y con concentraciones de torisel de 0; vehículo; 2,5 ó 1000 ng/ml. (C) Células U251MG incubadas durante 24, 48 y 72 horas con concentraciones de rapamicina de 0 ng/ml; vehículo; 2,5 ó 1000 ng/ml. (D) Células U251MG incubadas 24, 48 y 72 horas con concentraciones de torisel de 0; vehículo; 2,5 ó 1000 ng/ml. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$.

Las células U87MG tratadas incrementan la expresión de ATP entre las 24 y 48 horas (de $7,5 \times 10^5$ a $8,6 \times 10^5$), manteniendo este valor a las 72 horas (Fig. 4.1.B).

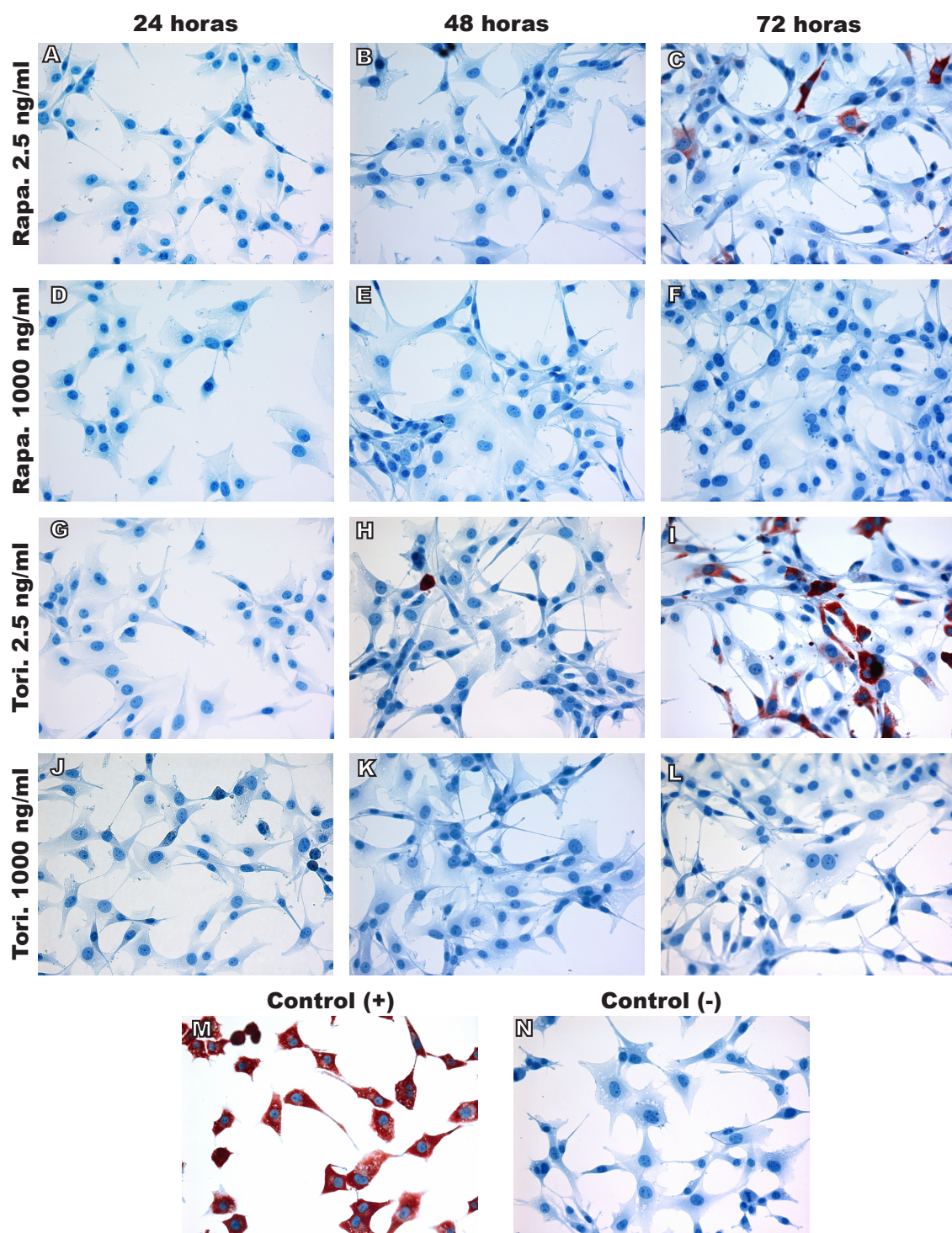
Los resultados para las células U251MG fueron diferentes que para U87MG. Siguiendo el mismo patrón que la rapamicina, las U251MG tratadas con torisel fueron capaces de duplicar la expresión de ATP entre las 24 y 72 horas (de $2,3 \times 10^6$ a $4,7 \times 10^6$ para 2,5 ng/ml y de $2,1 \times 10^6$ a $4,3 \times 10^6$ para 1000 ng/ml) (Fig. 4.1.D).

Como se aprecia, ambos compuesto fueron capaces de inhibir el crecimiento celular en ambas líneas celulares aunque el efecto citostático fue menor para la línea celular U251MG que para la línea U87MG. Las U251MG duplicaron la señal de ATP en 72 horas mientras que las U87MG sólo fueron capaces de incrementar ligeramente la señal.

4.1.2. Detección de pS6 in vitro mediante inmunocitoquímica

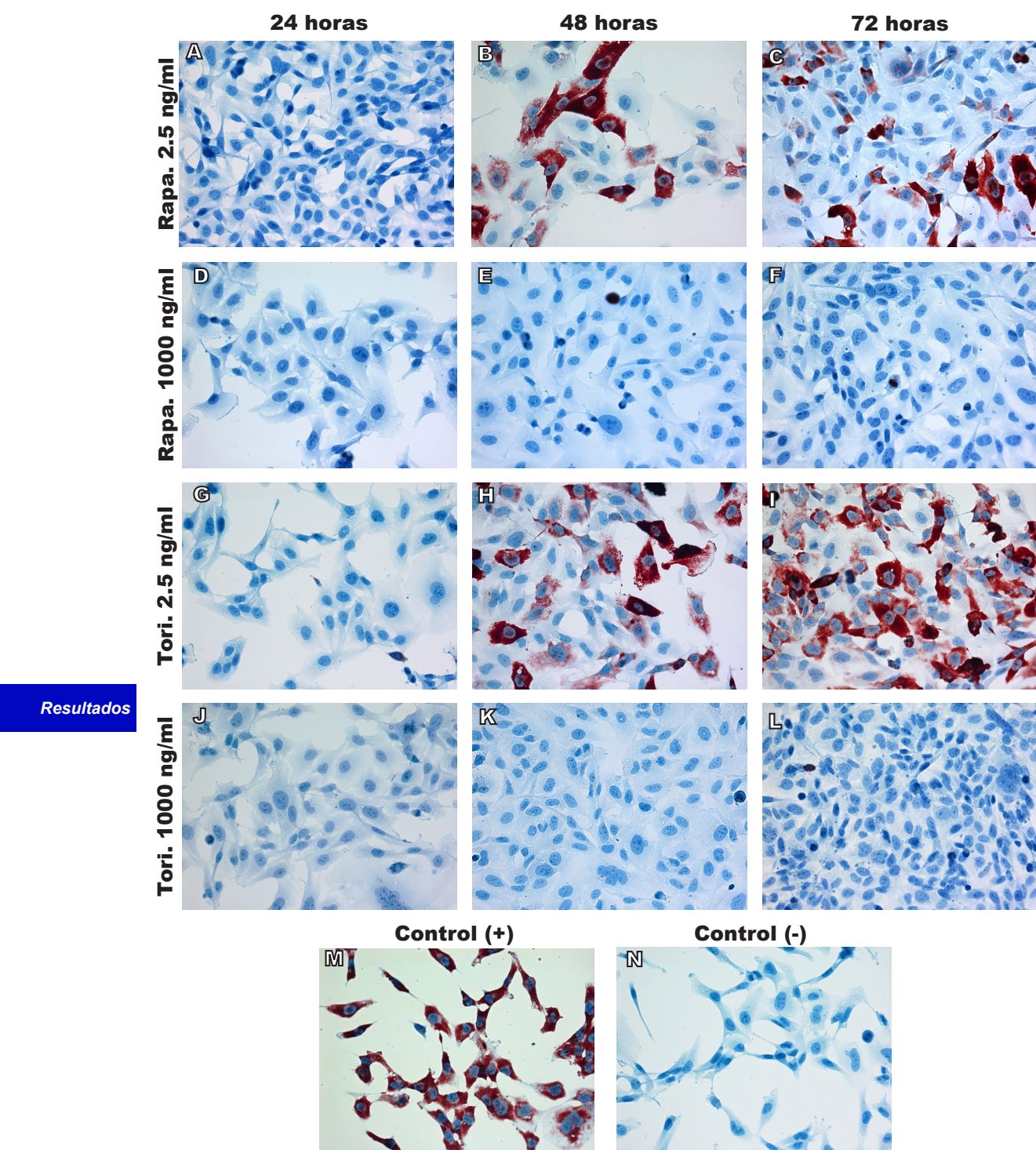
Se realizó el estudio de la fosforilación de la proteína S6, pasadas 24, 48 y 72 horas desde la administración de los compuestos en ambas líneas celulares.

Se encontraron altos niveles de la proteína S6 fosforilada tanto en la línea U87MG (Fig. 4.2.M) como en U251MG (Fig. 4.3.M), lo cual es un reflejo de la activación de la



Resultados

Fig. 4.2 Análisis inmunocitoquímico para la detección de pS6 en células U87MG. (A, B y C) U87MG tratadas con 2,5 ng/ml de rapamicina a 24, 48 y 72 horas. (D, E y F) U87MG tratadas con 1000 ng/ml de rapamicina a 24, 48 y 72 horas. (G, H y I) U87MG tratadas con 2,5 ng/ml de torisel a 24, 48 y 72 horas. (J, K y L) U87MG tratadas con 1000 ng/ml de torisel a 24, 48 y 72 horas. (M) U87MG sin tratar como control (+). (N) Control (-) U87MG sin tratar realizada la tinción sin anticuerpo primario (x 40).



Resultados

Fig. 4.3 Análisis inmunocitoquímico para la delección de pS6 en células U251MG. (A, B y C) U251MG tratadas con 2,5 ng/ml de rapamicina a 24, 48 y 72 horas. (D, E y F) U251MG tratadas con 1000 ng/ml de rapamicina a 24, 48 y 72 horas. (G, H y I) U251MG tratadas con 2,5 ng/ml de torisel a 24, 48 y 72 horas. (J, K y L) U251MG tratadas con 1000 ng/ml de torisel a 24, 48 y 72 horas. M) U251MG sin tratar como control (+). N) Control (-) U251MG sin tratar realizada la tinción sin anticuerpo primario (x 40).

vía mTOR . Después del tratamiento con rapamicina o torisel, se observó una inhibición de la fosforilación de la proteína S6. En las células U87MG, la inhibición total de la fosforilación se prolongó durante 72 horas para la concentración mayor de los fármacos (1000 ng/ml) (Fig. 4.2.F y Fig. 4.2.L). Cuando se utilizó la concentración menor (2,5 ng/ml) de ambos fármacos, la inhibición no fue completa hasta las 72 horas (Fig. 4.2.C y Fig. 4.2.I); apareciendo células positivas para pS6 en dicho tiempo en ambos casos.

El estudio aplicado a las U251MG mostró algunas diferencias con respecto a las U87MG. Si bien con una concentración de 1000 ng/ml, la expresión de la pS6 se mantuvo completamente inhibida durante 72 horas (Fig. 4.3.F y Fig. 4.3.L), al utilizar la concentración de 2,5 ng/ml, la inhibición empieza a desaparecer a las 48 horas con ambos fármacos (Fig. 4.3.B y Fig. 4.3.H).

La detección de la pS6 tras la adición de los fármacos, fue diferente entre ambas líneas celulares. Además se detectó una pequeña diferencia entre las células tratadas con rapamicina y las tratadas con torisel a la misma concentración. La rapamicina muestra mayor efectividad, a la hora de inhibir la fosforilación de la S6 que el torisel. A las 72 horas y con una concentración del fármaco de 2,5 ng/ml, aparecieron menos células U87MG positivas empleando rapamicina que utilizando torisel (Fig. 4.2.C y Fig. 4.2.I).

Cuando comparamos la inhibición de la fosforilación de S6 en las células U251MG, se observa el mismo patrón que el obtenido para las células U87MG. Al suministrar torisel a 2,5 ng/ml durante 72 horas se observan más células con tinción positiva para pS6 que con rapamicina (Fig. 4.3.C y Fig. 4.3.I).

4.1.3. Detección de pS6 in vitro mediante ELISA

Los niveles de proteína S6 fosforilada fueron cuantificados mediante ELISA a las 24, 48 y 72 horas tras la administración de rapamicina o torisel. Los niveles de pS6 se vieron disminuidos más de 5 veces con la adición de ambos compuestos.

Se observa, en las células U87MG, que tras 24 horas de incubación con 2,5 ó 1000 ng/ml de rapamicina o torisel, se reduce la expresión de la proteína pS6 a valores de densidad óptica O.D. (del inglés: Optical Density) de 0,5, representando el 12% de la expresión con respecto a las células no tratadas, que presentaron una O.D.= 3,9 ($p < 0.001$) (Fig. 4.4.A, 4.4.C). Transcurridas 48 y 72 horas desde la administración de rapamicina o torisel a las células U87MG, la fosforilación de S6 continuó inhibida. No se aprecia una diferencia significativa entre los tiempos de incubación en las dos concentraciones utilizadas: 2,5 y 1000 ng/ml (Fig. 4.4.A, 4.4.C).

La administración de rapamicina o torisel a las células U251MG también causa una reducción en los niveles de fosforilación de la proteína S6. La incubación con 2,5 ó 1000 ng/ml de rapamicina reduce los valores de O.D. por debajo de 0,5 (12% del control) a las 24 horas, menores de 0,7 (18%) a las 48 horas e inferiores a 0,9 (22%) a las 72 horas. Las células no tratadas presentan valores de O.D. de 3,9 en todos los tiempos de incubación. No se encontró una diferencia significativa entre las dos concentraciones:

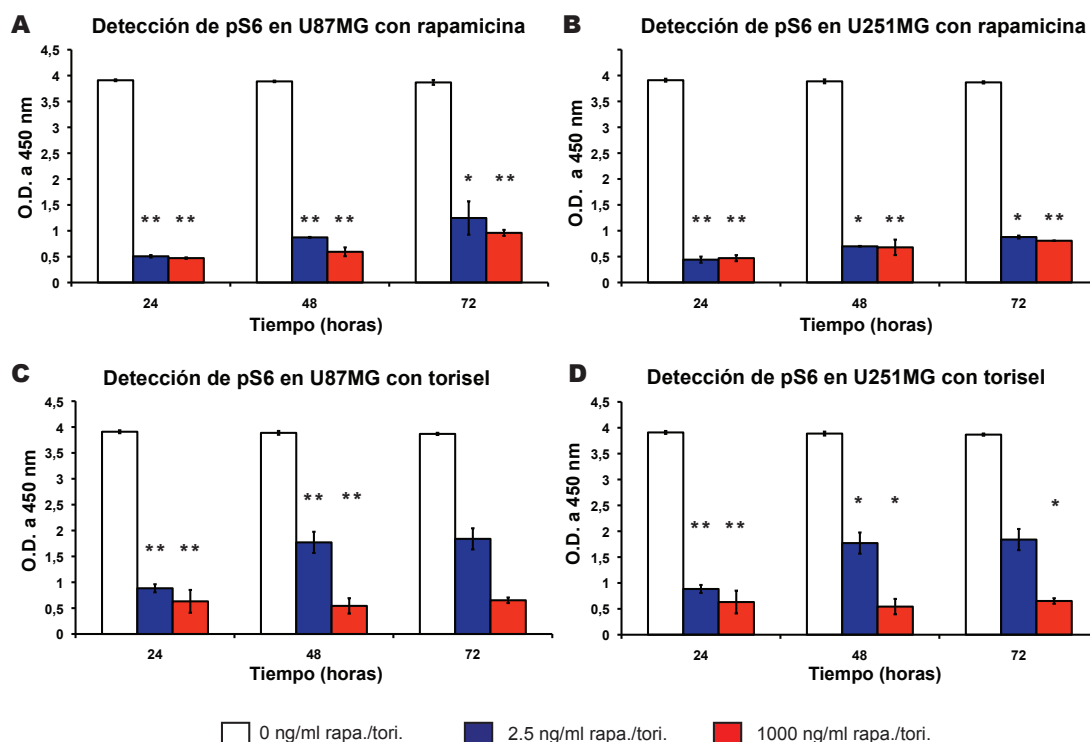


Fig. 4.4 Cuantificación de los niveles de pS6 mediante ELISA a diferentes tiempos de incubación y distintas concentraciones de los fármacos. (A) Células U87MG tratadas durante 24, 48 y 72 horas con 0; 2,5 ó 1000 ng/ml de rapamicina. (B) Células U251MG tratadas durante 24, 48 y 72 horas con 0; 2,5 ó 1000 ng/ml de rapamicina. (C) Células U87MG tratadas durante 24, 48 y 72 horas con 0; 2,5 ó 1000 ng/ml de torisel. (D) Células U251MG tratadas durante 24, 48 y 72 horas con 0; 2,5 ó 1000 ng/ml de torisel. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$.

2,5 y 1000 ng/ml (Fig. 4.4.B). En el caso del torisel, se aprecia una diferencia significativa entre la administración de 2,5 ó 1000 ng/ml a 48 horas de incubación. Los valores de O.D. a 48 horas fueron 1,7 (45%) para 2,5 ng/ml, 0,5 (14%) para 1000 ng/ml ($p < 0,05$, comparación entre las distintas concentraciones) y O.D.= 3,9 para células no tratadas (Fig. 4.4.D).

4.1.4. Estudio del ciclo celular in vitro

Para determinar si las concentraciones de rapamicina empleadas generaban diferentes perfiles de ciclo celular se llevó a cabo un experimento en el cual se analizaron los mismos 48 horas después del tratamiento de células U87MG con 2,5 ng/ml o 1000 ng/ml de rapamicina (Fig. 4.5.).

Las células expuestas al vehículo no mostraron diferencias en el ciclo celular respecto a las células control (Fig. 4.5.B). Las células U87MG expuestas a 2,5 ng/ml de rapamicina, mostraron un pequeño incremento en G1 (75,14%) con respecto a las células no tratadas (67,17%) y un descenso significativo ($p < 0,05$) en la fase G2 (13,74% vs 18,48%) (Fig. 4.5.C). Cuando el fármaco fue aplicado a 1000 ng/ml, se obtuvieron similares resultados. La fase G1 se incrementó con respecto al control (78,52% vs

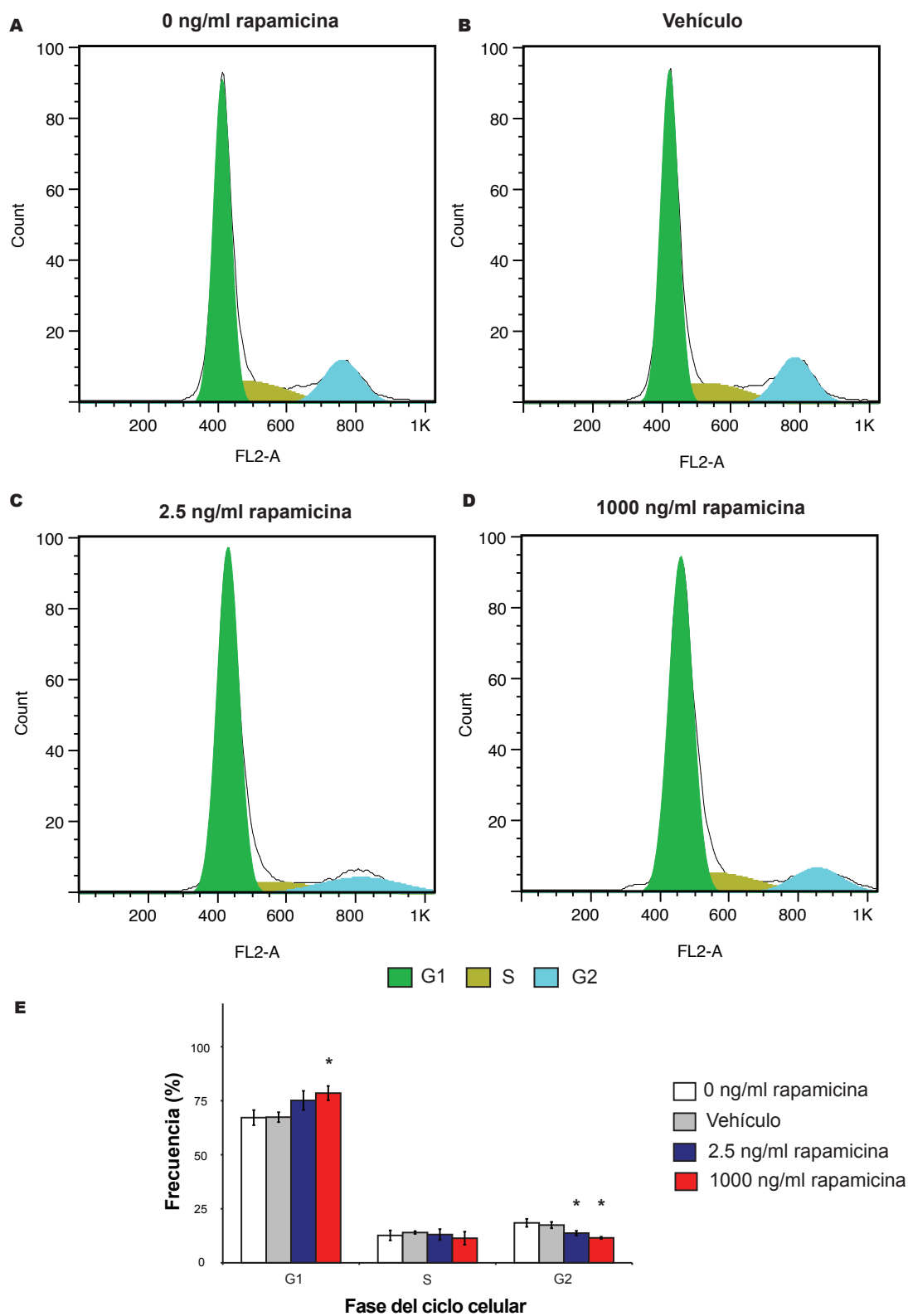


Fig. 4.5. Análisis del ciclo celular de células U87MG tratadas con: (A) 0 ng/ml de rapamicina, control; (B) vehículo de rapamicina; (C) 2,5 ng/ml de rapamicina; (D) 1000 ng/ml de rapamicina. (E) Gráfico que representa la frecuencia de cada fase del ciclo celular tras la adición de rapamicina. (*) $p < 0,05$.

67,17%; $p<0,05$), mientras que la fase G2 se redujo con respecto al control (11,55% vs 18,48%; $p<0,05$) (Fig. 4.5.D).

De esta forma, no se observaron diferencias entre los perfiles de ciclo celular incluso habiendo incrementado 400 veces la concentración de rapamicina generándose en ambos casos una tendencia al arresto en G1 (Fig. 4.5.E).

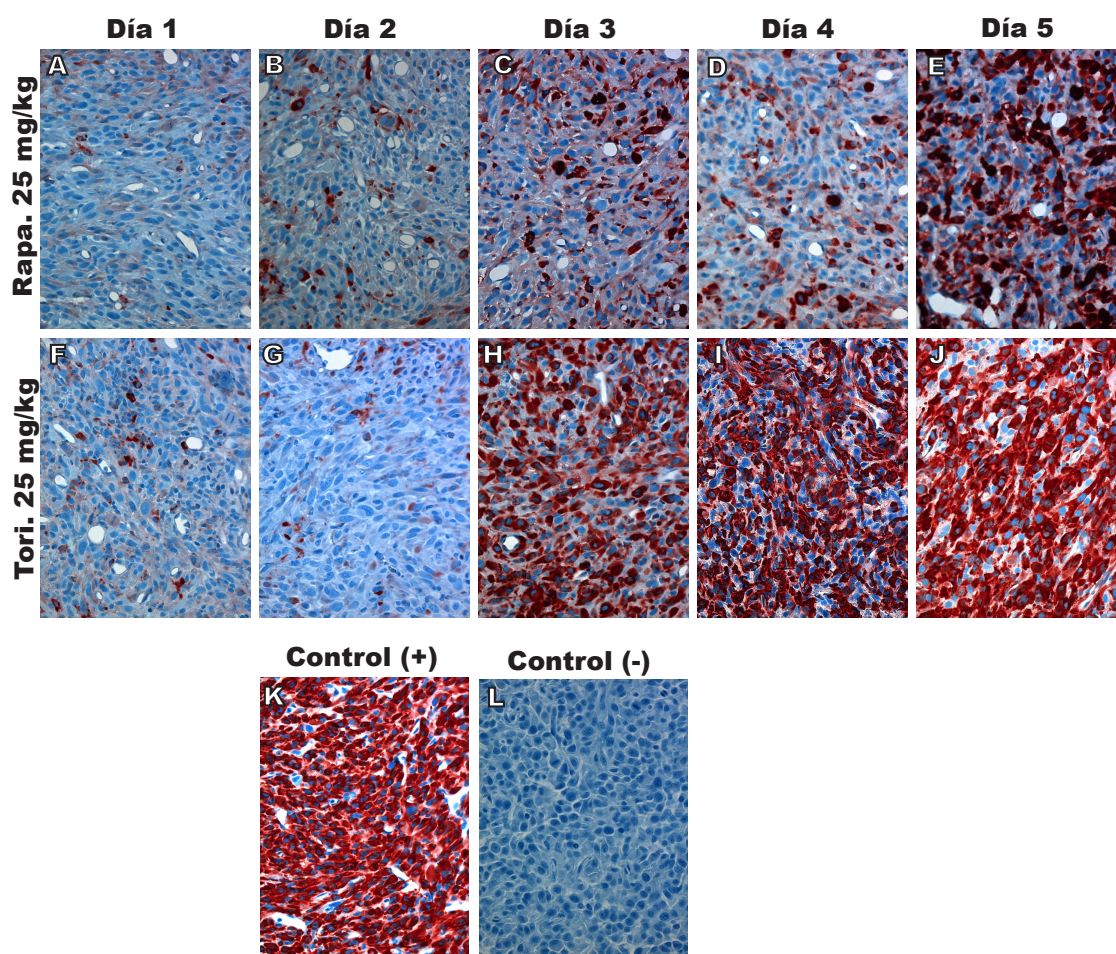
4.1.5. Detección de pS6 in vivo mediante inmunohistoquímica (IHC)

Una vez optimizado el protocolo para la detección de la proteína S6 fosforilada en cultivos celulares, habiendo observado diferencias a lo largo del tiempo en el estado de la fosforilación, se decidió realizar un experimento similar empleando cerebros de ratas xenotransplantadas con U87MG (Tabla 4.1). De esta forma pudimos determinar cuánto tiempo era capaz de mantenerse inhibida la vía de mTOR tras administraciones intraperitoneales de rapamicina o torisel al animal.

Al analizar los tumores intracraneales U87MG, se detectó una alta expresión de la fosforilación de la proteína S6 en los cerebros controles (Fig. 4.6.K). Tras el tratamiento de 25 mg/kg con rapamicina o torisel se anula casi por completo la fosforilación de S6 en los tumores.

Tabla 4.1 Animales empleados

Fármaco	Dosis	Calendario tratamiento (días)	Tipo de administración	n	Estudio
Rapamicina	25 mg/kg	7	i.p.	10	IHC
Torisel	25 mg/kg	7	i.p.	10	IHC
Vehículo rapamicina		7	i.p.	2	IHC
Rapamicina	10 mg/kg	7	i.p.	10	ELISA
Rapamicina	25 mg/kg	7	i.p.	10	ELISA
Torisel	25 mg/kg	7	i.p.	10	ELISA
Vehículo rapamicina		7	i.p.	2	ELISA
Rapamicina	2 µg	7-14	Bomba	2	Toxicidad
	10 mg/kg	7,8,9,15,16,17	i.p.		
Rapamicina	10 mg/kg	Cada 7	i.p.	6	Supervivencia
Rapamicina	25 mg/kg	Cada 7	i.p.	5	Supervivencia
Rapamicina	10 mg/kg	Cada 5	i.p.	6	Supervivencia
Rapamicina	10 mg/kg	7,8,9,15,16,17	i.p.	5	Supervivencia
Rapamicina	2 µg	7-14	Bomba	5	Supervivencia
	10 mg/kg	7,8,9,15,16,17	i.p.		
Torisel	25 mg/kg	Cada 7	i.p.	5	Supervivencia
Torisel	10 mg/kg	7,8,9,15,16,17	i.p.	5	Supervivencia
Vehículo rapamicina		Cada 7	i.p.	6	Supervivencia
Vehículo rapamicina		Cada 5	i.p.	6	Supervivencia
Vehículo rapamicina		7,8,9,15,16,17	i.p.	6	Supervivencia



Resultados

Fig. 4.6. Detección inmunohistoquímica de pS6 en secciones de tumor generado por U87MG. (A-E) Animales tratados con 25 mg/kg de rapamicina 1, 2, 3, 4 y 5 días después de la inyección i.p. (F-J) Animales tratados con 25 mg/kg de torisel 1, 2, 3, 4 y 5 días después de la inyección i.p. (K) Control (+) de tinción para la cual se emplearon tumores sin tratar. (L) Control (-) de la tinción realizado de la misma forma que el positivo pero sin anticuerpo primario. (x 40).

Las ratas tratadas con 25 mg/kg de rapamicina mantienen bajos los niveles de fosforilación de pS6 hasta 4 días después de la inyección intraperitoneal (Fig. 4.6.D). El quinto día después del tratamiento, la fosforilación de S6 comienza a aumentar, pero sin llegar a los niveles del tumor control, ya que conserva células sin señal (Fig. 4.6.E).

Cuando se administra torisel a las ratas xenotransplantadas, la inmunohistoquímica muestra diferencias con respecto a la rapamicina. Con la misma dosis de 25 mg/kg, la inhibición total de la fosforilación de la S6 se mantiene sólo durante los 2 primeros días después de la inyección intraperitoneal (Fig. 4.6.G). En los días subsiguientes, las células positivas para pS6 comenzaron a incrementarse alcanzando niveles próximos al control en el quinto día después de la administración (Fig. 4.6.J).

Para la misma dosis, los resultados del análisis no fueron idénticos en ambos fármacos, siendo la rapamicina capaz de mantener inhibida in vivo la vía de mTOR durante más tiempo.

4.1.6. Detección de pS6 in vivo mediante ELISA

Ya que los resultados de la IHC para pS6 no aportaban un dato cuantitativo preciso de la inhibición de la vía mTOR, se decidió realizar el análisis de la proteína S6 en forma fosforilada presente en tumores intracraneales 1, 2, 3, 4, y 5 días después del tratamiento mediante inyección intraperitoneal de rapamicina o torisel mediante ELISA (Tabla 4.1).

La dosis de 10 mg/kg de rapamicina generó un descenso de la fosforilación de la proteína S6 de más de 7 veces hasta 4 días después de la inyección. El valor de O.D. para el cerebro control fue de 1,05 (Fig. 4.7.A, 4.7.B, 4.7.C), mientras que en los animales tratados los valores de O.D. fueron de 0,14; 0,12; 0,11 y 0,16 respectivamente en los días 1, 2, 3 y 4 posteriores a la inyección (Fig. 4.7.A). El nivel de pS6 se incrementó el día 5 hasta un valor O.D.: 0,47 (Fig. 4.7.A), siendo este valor inferior al 50% del valor obtenido en un animal sin tratar.

La fosforilación de la proteína ribosómica S6 disminuyó cuando se inyectaron 25 mg/kg de rapamicina. La inhibición de la fosforilación se mantuvo al menos hasta 5 días después de la administración intraperitoneal de 25 mg/kg de rapamicina. Los valores de O.D. obtenidos fueron = 0,26; 0,19; 0,17; 0,08 y 0,103 los días 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente (Fig. 4.7.B).

Resultados

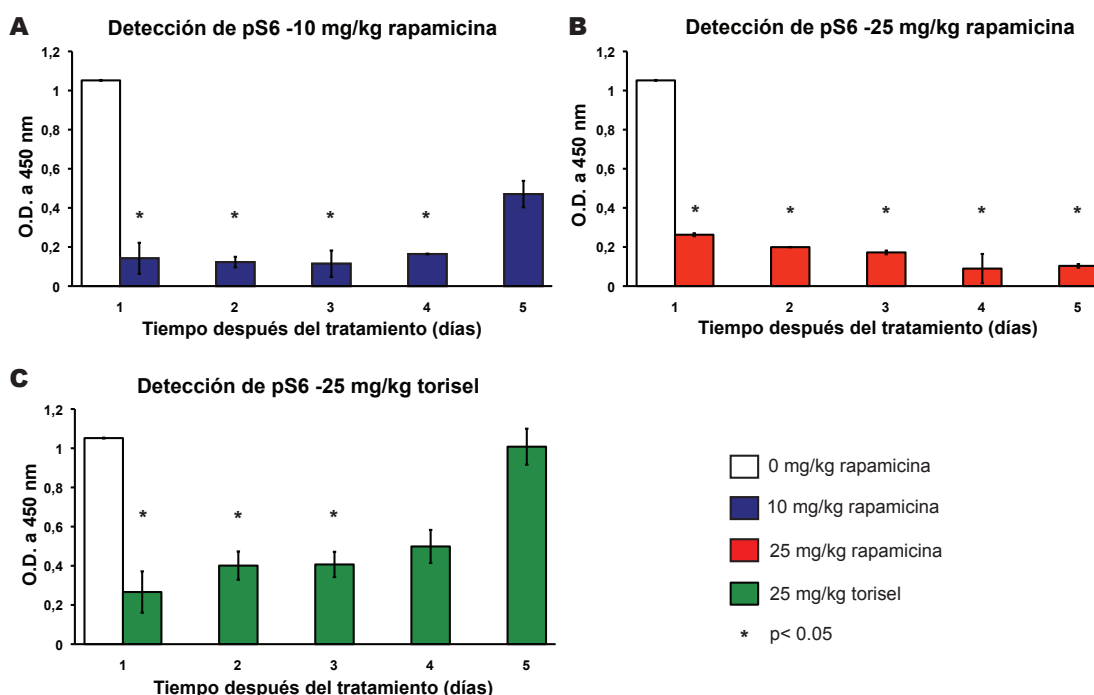


Fig. 4.7 Cuantificación del nivel de fosforilación de S6 mediante ELISA en tumores U87MG a 1, 2, 3, 4 y 5 días después de la administración i.p. (A) Animales tratados con 10 mg/kg de rapamicina 1, 2, 3, 4 y 5 días después de la inyección i.p. (B) Animales tratados con 25 mg/kg de rapamicina 1, 2, 3, 4 y 5 días después de la inyección i.p. (C) Animales tratados con 25 mg/kg de torisel 1, 2, 3, 4 y 5 días después de la administración i.p. (*) p< 0,05.

El tratamiento con torisel a 25 mg/kg generó inhibición más débil de la fosforilación de la proteína S6. Los valores de O.D. para los días 2, 3 y 4 fueron 0,4; 0,4, y 0,49 respectivamente. El valor en el día 5 se incrementó hasta 1,0, siendo el valor del control 1 (Fig. 4.7.C).

4.1.7. Toxicidad sistémica

Para los experimentos de supervivencia descritos en esta sección, se eligieron diferentes calendarios y dosis con el objetivo de mejorar el tratamiento con rapamicina. Los diferentes grupos empleados se detallan en la [tabla 4.1](#).

Durante el experimento de supervivencia, se realizó un seguimiento continuo de los posibles síntomas de toxicidad que pudieran desarrollar los animales empleados en la determinación de la eficacia antitumoral de la rapamicina y el torisel.

Aunque en algunos casos, las ratas mostraron escaso pelo, se observó en todos los animales tratados, tanto con rapamicina como con torisel, la pérdida del pelo en torno a los 15 días desde el comienzo del tratamiento. No obstante, todos los animales fueron capaces de recuperar el pelo una vez el tratamiento hubo concluido.

El peso de los animales fue también registrado ya que es un posible síntoma de toxicidad derivado de los fármacos. Se consideró que una pérdida mayor del 15% del peso suponía un riesgo para la vida del animal y se procedió al sacrificio del mismo si esto sucedía.

La [figura 4.8.A](#) muestra la variación del peso de los animales que recibieron 10 mg/kg de rapamicina siguiendo diferentes calendarios de administración. Todos los animales sufrieron una pérdida de peso después de la implantación del tumor inferior al 7% de su peso inicial. Cuando los animales recibieron la administración intraperitoneal de rapamicina, sufrieron una pérdida de peso de entre el 0,63% y el 10,49%.

Los animales que recibieron rapamicina una vez por semana o cada 5 días, fueron capaces de recuperar parcialmente el peso perdido antes de la nueva inyección. En cambio, los animales que recibieron el tratamiento del ciclo, sólo recuperaron el peso una vez que finalizó el tratamiento. Los animales que recibieron el tratamiento cada 5 días mostraron menor tendencia a perder peso que los animales del resto de grupos al principio del tratamiento. En todos los grupos, se observó una pérdida de peso los días anteriores a la muerte de las ratas probablemente causada por el tumor.

Cuando comparamos la variación de peso de las ratas tratadas con 10 ó 25 mg/kg de rapamicina una vez por semana ([Fig. 4.8.B](#)), no se observa ninguna diferencia. En ambos casos, los animales pierden peso después de la implantación del tumor y también después de cada inyección, siendo capaces ambos grupos de animales de recuperar algo de peso entre cada dosis.

El tratamiento con torisel genera los mismos resultados que la rapamicina. En todos los animales se observa una pérdida de peso después de la inyección, aunque estas pérdidas fueron algo menores que las observadas en el casos de la rapamicina, fluctuando de 0,8 % a 7,05 % ([Fig. 4.8.C](#)).

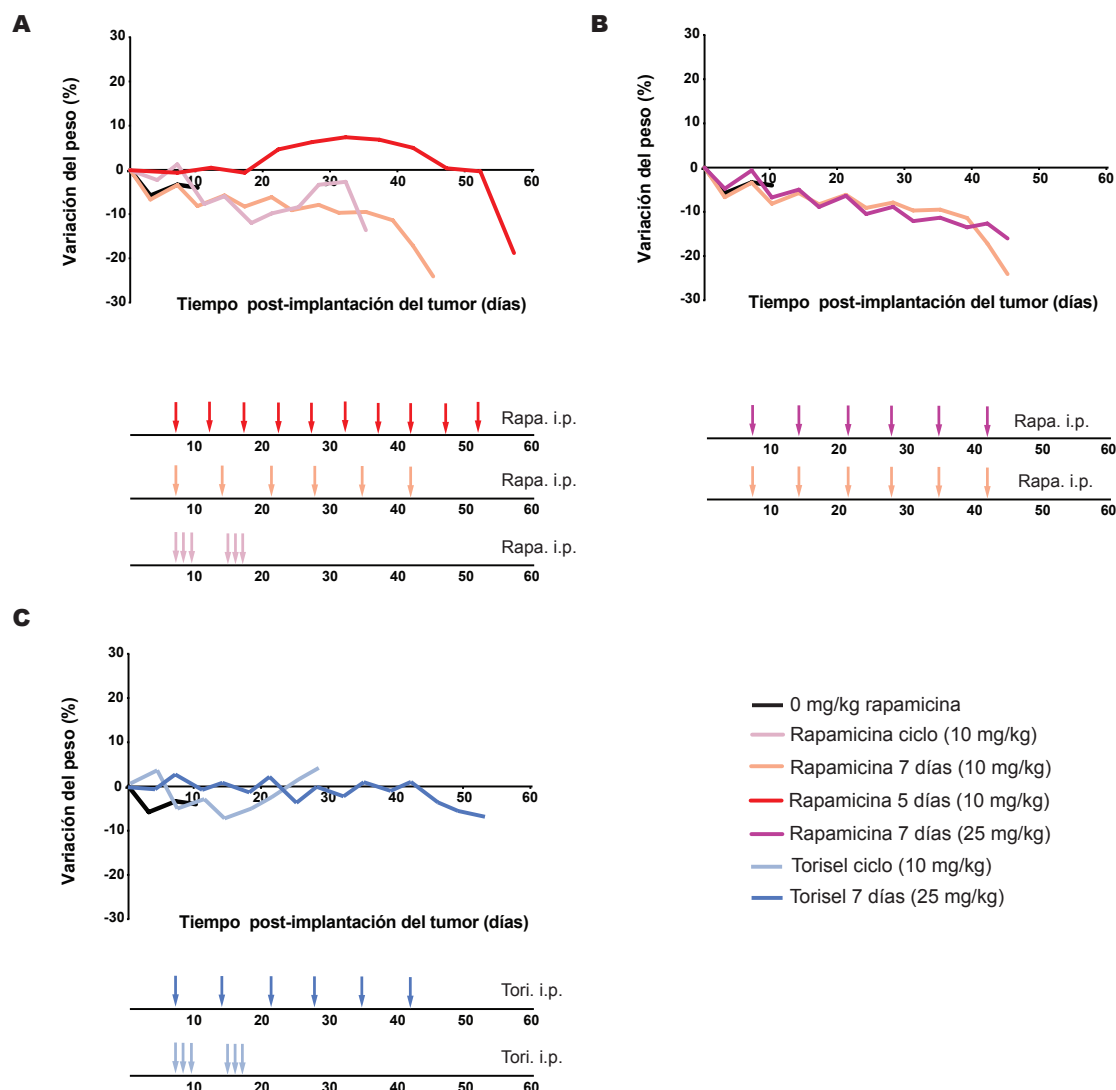


Fig. 4.8 Evolución del peso de los animales xenotransplantados con células U87MG. (A) Animales tratados con 10 mg/kg de rapamicina intraperitoneal con diferentes calendarios de administración: ciclo (días 7, 8, 9, 15, 16 y 17 después del implante); 7 días (cada 7 días, comenzando el día 7 tras el implante del tumor); 5 días (cada 5 días, comenzando el día 7 tras el implante del tumor). (B) Animales tratados cada 7 días, comenzando el día 7 tras el implante del tumor, con 10 mg/kg o 25 mg/kg de rapamicina. (C) Animales tratados con 10 mg/kg de torisel: ciclo (días 7, 8, 9, 15, 16 y 17 después del implante); o 25 mg/kg de torisel cada 7 días, comenzando el día 7 tras el implante del tumor.

4.1.8. Aumento de la supervivencia de animales con xenotransplantes intracraneales de U87MG tratados con rapamicina o torisel de forma sistémica

Los estudios de supervivencia se realizaron utilizando el modelo bien establecido de xenotransplante ortotópico de la línea de GBM humano U87MG (Fig. 4.9).

Cuarenta ratas inmunodeficientes recibieron células tumorales U87MG en el estriado; las ratas fueron divididas aleatoriamente en ocho grupos (Tabla 4.1). El tratamiento comenzó 7 días después de la implantación de las células, recibiendo la primera dosis intraperitoneal de rapamicina, torisel o del vehículo dependiendo del grupo.

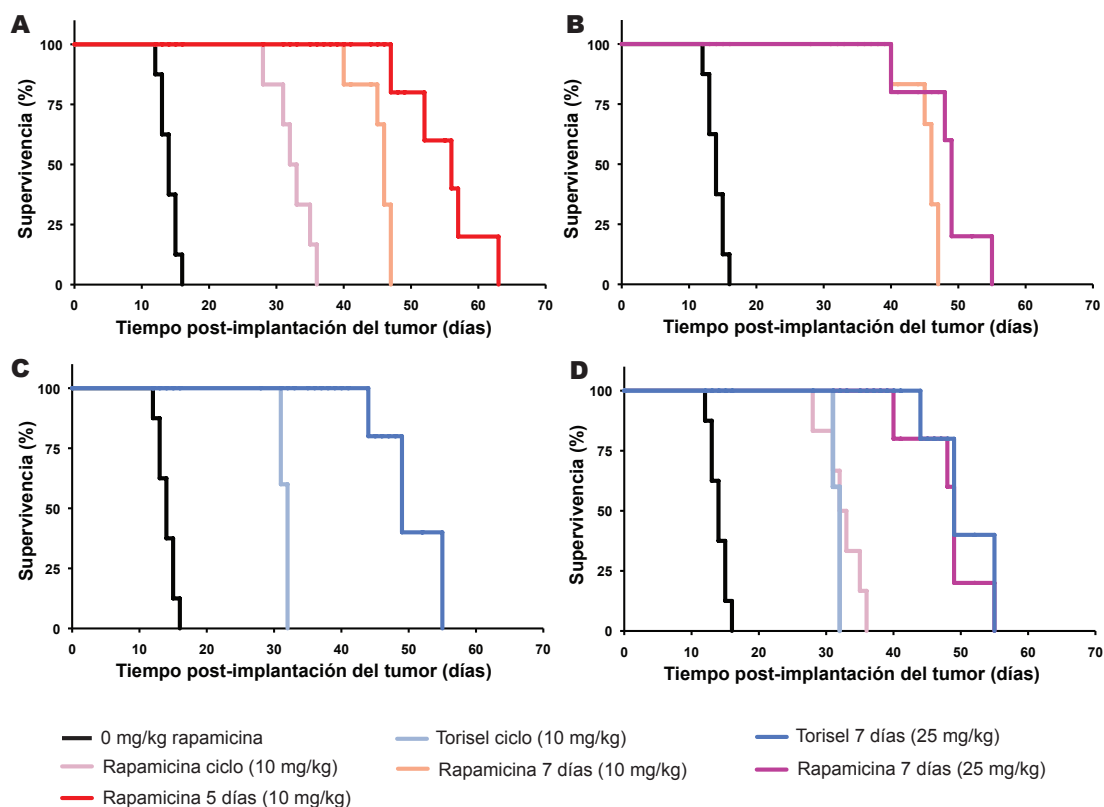


Fig. 4.9 Estudio de supervivencia en animales xenotransplantados ortotópicamente con células U87MG. (A) Animales tratados con 10 mg/kg de rapamicina con diferentes calendarios de administración: ciclo (días 7, 8, 9, 15, 16 y 17 después del implante); 7 días (cada 7 días, comenzando el día 7 tras el implante del tumor); 5 días (cada 5 días, comenzando el día 7 tras el implante del tumor). (B) Animales tratados cada 7 días, comenzando el día 7 tras el implante del tumor, con 10 mg/kg o 25 mg/kg de rapamicina. (C) Animales tratados con 10 mg/kg de torisel: ciclo (días 7, 8, 9, 15, 16 y 17 después del implante); o 25 mg/kg de torisel cada 7 días, comenzando el día 7 tras el implante del tumor. (D) Comparación entre el tratamiento con torisel y rapamicina. Animales tratados con 10 mg/kg de torisel o rapamicina: ciclo (días 7, 8, 9, 15, 16 y 17 después del implante); o 25 mg/kg de torisel o rapamicina cada 7 días, comenzando el día 7 tras el implante del tumor.

Resultados

Todas las ratas control desarrollaron, entre los días 12-16 después del implante, los síntomas neurológicos asociados a tumores intracraneales grandes y fueron sacrificadas. La existencia de tumor fue posteriormente confirmada mediante el estudio histológico del cerebro (supervivencia media, del inglés: Median Survival, MS= 14 días).

Los animales tratados con 10 mg/kg de rapamicina los días 7, 8, 9, 15, 16 y 17 post-implantación del tumor (tratamiento ciclo), mostraron un incremento en la supervivencia, muriendo todos los animales entre los días 28 y 36 (MS=32,5 días, $P=0,000321$).

Utilizando una dosis igual de 10 mg/kg, el tratamiento administrado una vez por semana produjo un aumento de la supervivencia, alcanzando los 40-47 días (MS=45,2 días, $P=0,000321$). Esto indica la superioridad del tratamiento diseñado como una dosis por semana frente al tratamiento mediante el ciclo ($P=0,00506$, comparación entre tratamientos) (Fig. 4.9.A). Los animales tratados con 10 mg/kg cada cinco días mostraron

un incremento aún mayor en la supervivencia, 47-57 días (MS=55 días, $P=0,000854$; $P=0,00554$) frente a los tratamientos de 10 mg/kg una vez a la semana (Fig. 4.9.A).

Sin embargo no se observó una mejoría en la supervivencia asociada al incremento de la dosis. El tratamiento de 25 mg/kg administrado una vez por semana, presentó una supervivencia de 40-55 días (MS=48,2 días, $P=0,000854$ y $P=0,0271$ no muy superior al de 10 mg/kg administrado también una vez por semana) (Fig. 4.9.B).

Los animales tratados con torisel tuvieron una supervivencia de 31-32 días con el ciclo de 10 mg/kg y 44-55 días con el tratamiento de 25 mg/kg administrado una vez por semana (MS=31,6 y MS=50,4 días; $P=0,000854$ y $P=0,000854$ respectivamente; $P=0,00315$ comparación entre los dos tratamientos de torisel), (Fig. 4.9.C).

Comparándose los dos fármacos para el ciclo de 10 mg/kg se obtuvo una MS=32,5 días para rapamicina y MS=31,6 días para torisel; la comparación entre tratamientos resultó en un $P=0,247$. Cuando se analizó el resultado para una dosis de 25 mg/kg en ambos fármacos, tampoco se obtuvo una diferencia significativa en los resultados de supervivencia, la rapamicina dio lugar a una MS=48,2 días y el torisel a una MS=50,4 días; $P=0,449$ (Fig. 4.9.D).

Los animales tratados que presentaban evidencias de progresión del tumor fueron sacrificados. Se realizó la evaluación histopatológica de los cerebros en todos los casos, observándose que había tenido lugar una clara progresión del tumor, siendo el motivo del deterioro de las funciones neurológicas del animal.

Resultados

4.1.9. Tratamiento in vivo con rapamicina administrada de forma local y sistémica

Se realizó un experimento para evaluar si la administración local y sistémica simultánea de rapamicina en animales portadores de tumores intracraneales generados por U87MG, producía un incremento en la supervivencia (Fig. 4.10).

Previamente al estudio de supervivencia, realizamos un análisis de la posible toxicidad del doble tratamiento en ratas Wistar. De esta forma se comprobó la ausencia de efectos tóxicos en los animales y las dosis pudieron ser aplicadas a las ratas inmunodeficientes.

Para el estudio de supervivencia, se generaron tumores de la forma previamente descrita. Siete días después del implante de las células, se confirmó la existencia del tumor mediante MRI (del inglés: Magnetic Resonance Image) (Fig. 4.10.A) pudiéndose determinar exactamente su localización y profundidad una vez formado (Fig. 4.10.B). Se comenzó el tratamiento el día 7 tras el implante. Se realizó un grupo control compuesto por 5 ratas. El segundo grupo recibió inyecciones intraperitoneales de 10 mg/kg de rapamicina los días 7, 8, 9, 15, 16 y 17 post-implante (tratamiento de ciclo). En cada animal del tercer grupo se implantó una bomba osmótica cargada con rapamicina (100 $\mu\text{g/ml}$), acoplada a una cánula de infusión cerebral. La bomba liberó su contenido a un flujo de 10 $\mu\text{l/hora}$ durante 7 días. Simultáneamente, este grupo recibió el mismo tratamiento de ciclo de inyecciones intraperitoneales los días 7, 8, 9, 15, 16 y 17 post-implante.

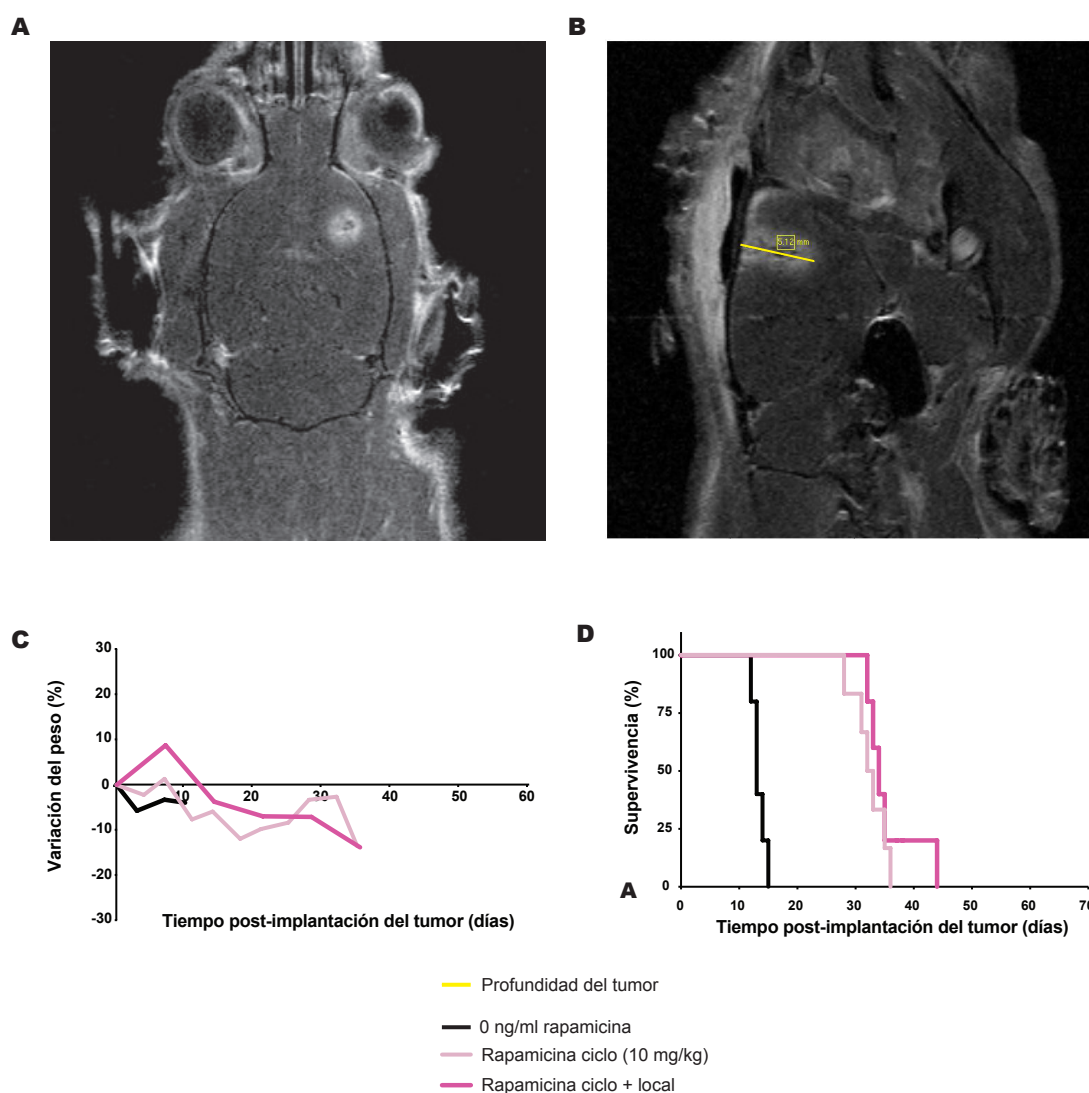


Fig. 4.10 Estudio de supervivencia en animales xenotransplantados con células U87MG tratados con rapamicina suministrada mediante inyección i.p. y localmente mediante bomba osmótica. (A) Imagen axial representativa de un animal con tumor U87MG, 7 días después del implante. (B) Imagen sagital representativa de un animal con tumor U87MG, 7 días después del implante. (C) Gráfica Kaplan-Meier de animales tratados con inyección i.p. con 10 mg/kg de rapamicina con tratamiento de ciclo (días 7, 8, 9, 15, 16 y 17 después del implante) y animales tratados con tratamiento de ciclo y de forma local mediante bombas osmóticas (rapamicina 100 µg/ml).

El peso de los animales fue registrado con la intención de evaluar la toxicidad del fármaco, aunque como ya se ha explicado previamente, se realizó un estudio de toxicidad en ratas sanas. La inyección intraperitoneal de rapamicina tuvo asociada una pérdida de peso de entre 2,2% y 13,76%. Los animales que recibieron sólo el tratamiento de ciclo recobraron el peso una vez finalizado el mismo. La implantación de la bomba osmótica a los animales no supuso pérdida de peso adicional con respecto a los animales que sólo recibieron rapamicina intraperitonealmente. Los días previos a la muerte de las ratas se observó un descenso del peso causado probablemente por la progresión del tumor (Fig. 4.10.C).

En torno a los días 12-16, todas las ratas control desarrollaron síntomas neurológicos provocados por tumores intracraneales grandes, posteriormente confirmados por el estudio histológico (MS=14 días). Los animales tratados intraperitonealmente con rapamicina a 10 mg/kg en los días 7, 8, 9, 15, 16 y 17 mostraron un incremento de la supervivencia, alcanzando los 28-36 días (MS=32,5 días, $P=0,000321$). No se apreció un incremento en la supervivencia asociado al tratamiento combinado con administración local y sistémica respecto a la administración sistémica. La supervivencia fue de 32-44 días (MS=35,6 días, $P=0,000714$; $P=0,373$ comparación entre el tratamiento con rapamicina administrada sistémicamente y la administración de rapamicina sistémica y local) (Fig. 4.10.D).

4.2. Administración potenciada por convección de rapamicina o torisel: toxicidad y eficacia en modelos de glioma intracraneal en ratas.

Considerando el efecto tóxico producido por la rapamicina o su análogo torisel al utilizarse en el tratamiento de ratas xenotransplantadas con U87MG tanto intracranealmente como de forma sistémica, se tomó la decisión de intentar reducir la toxicidad utilizando un sistema de administración intratumoral directa del fármaco. Utilizamos el sistema CED ya que existía evidencia de reducción de la toxicidad respecto a la administración sistémica. Este método implicaba una disminución de la concentración del fármaco al aplicarse directamente en el tumor sin verse afectado por la BBB (Kikuchi et al. 2008).

4.2.1. Estudio de la toxicidad tisular

Antes de tratar a las ratas inmunodeficientes xenotransplantadas, realizamos un experimento para evaluar la posible toxicidad cerebral provocada por la administración directa de los fármacos y poder determinar la dosis máxima tolerada (Tabla 4.2).

La rapamicina o el torisel fueron administrados con instilación en un volumen total de 20 μ l, utilizando CED en cerebros de ratas adultas inmunocompetentes, en el hemisferio derecho, a un flujo de 0,5 μ l/min. Para el análisis de la toxicidad del vehículo, se aplicó simultáneamente en el hemisferio izquierdo la misma cantidad de etanol que la empleada para disolver los fármacos inyectados en el hemisferio derecho. Se emplearon diluciones seriadas de los fármacos para encontrar la máxima concentración que no genera daño inaceptable en el tejido. Se utilizaron concentraciones de 500; 100; 50; 10; 1; 0,5; 0,1 y 0,05 μ g/ml de rapamicina o torisel (Fig. 4.11 y 4.12).

Los animales fueron sacrificados, 7 días después de la aplicación del tratamiento. Se realizó el análisis de los cerebros mediante una tinción con hematoxilina y eosina, encontrándose evidencias histológicas de daño neurotóxico para la concentración más alta, 500 μ g/ml, no sólo con los fármacos sino también con el vehículo. Este hecho indica que la concentración de etanol utilizada en la dosis más alta era tóxica (Fig. 4.11.A y 4.12.A).

En los animales que recibieron fármacos mediante CED a menores concentraciones, el tejido cerebral mostró un ligero trauma en el lugar de la cánula, en el estriado, sin mayores síntomas de toxicidad aparente en el tejido (Fig. 4.11.B-H y 4.12.B-H).

No se observaron signos de toxicidad sistémica, como el descenso del peso y la pérdida del pelo, con ninguno de los tratamientos mediante CED. Tampoco se apreciaron cambios significativos neurológicos o de comportamiento tras el tratamiento. La concentración máxima tolerada de rapamicina y torisel utilizando la administración por CED fue establecida en 100 μ g/ml.

Tabla 4.2 Animales empleados

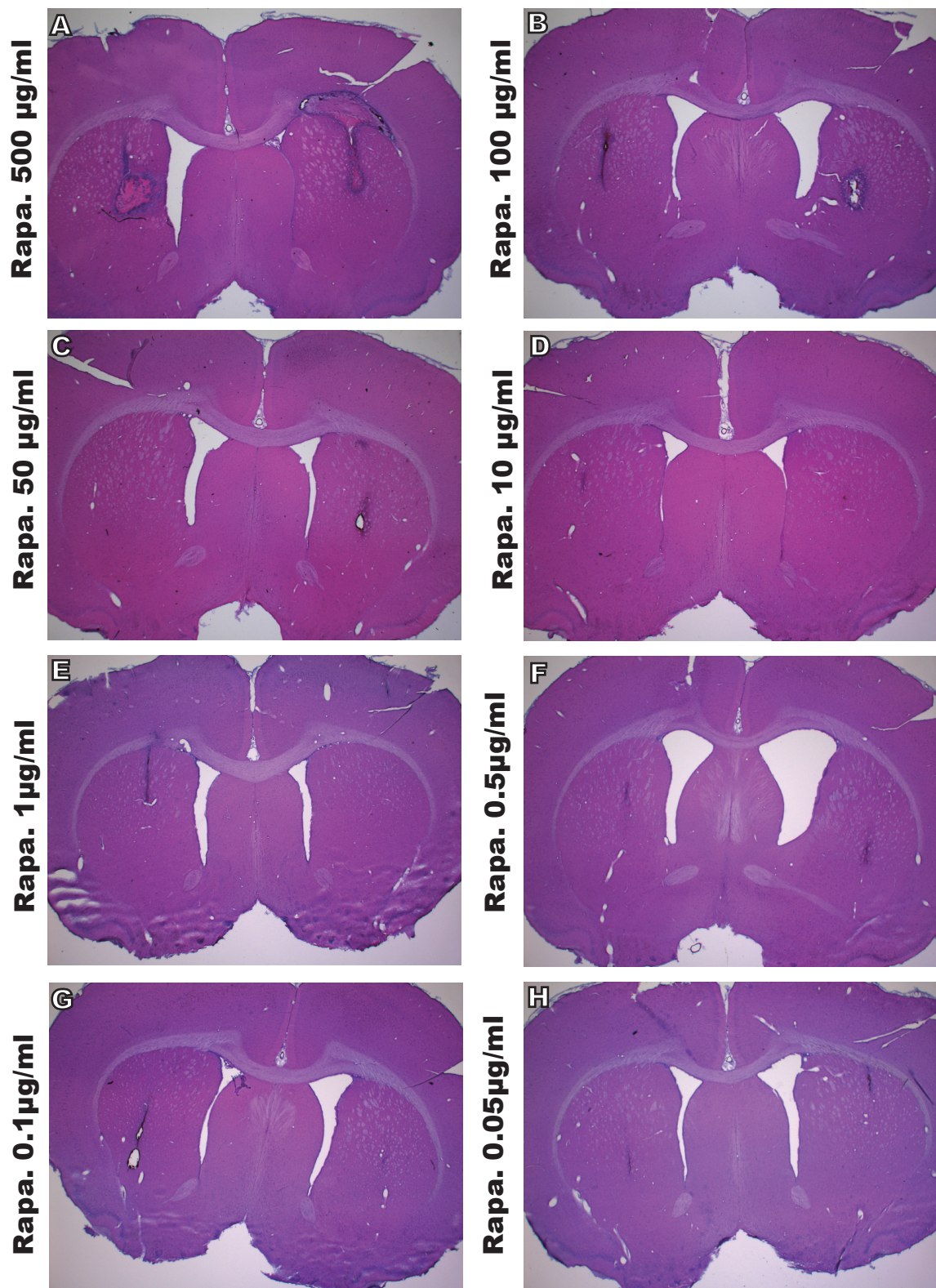
Fármaco	Dosis	Calendario tratamiento (días)	Tipo de administración	n	Estudio
Rapamicina	10 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	50%	7	CED		Toxicidad
Rapamicina	2 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	10%	7	CED		Toxicidad
Rapamicina	1 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	5%	7	CED		Toxicidad
Rapamicina	0.2 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	0.1%	7	CED		Toxicidad
Rapamicina	0.02 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	0.01%	7	CED		Toxicidad
Rapamicina	0.01 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	0.05%	7	CED		Toxicidad
Rapamicina	0.002 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	0.001%	7	CED		Toxicidad
Rapamicina	0.001 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	0.005%	7	CED		Toxicidad
Torisel	10 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	50%	7	CED		Toxicidad
Torisel	2 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	10%	7	CED		Toxicidad
Torisel	1 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	5%	7	CED		Toxicidad
Torisel	0.2 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	0.1%	7	CED		Toxicidad
Torisel	0.02 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	0.01%	7	CED		Toxicidad
Torisel	0.01 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	0.05%	7	CED		Toxicidad
Torisel	0.002 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	0.001%	7	CED		Toxicidad
Torisel	0.001 µg	7	CED	2	Toxicidad
Etanol	0.005%	7	CED		Toxicidad
Rapamicina	2 µg	7	CED	10	IHC
Torisel	2 µg	7	CED	10	IHC
Etanol	10%	7	CED	2	IHC
Rapamicina	2 µg	7	CED	10	ELISA
Torisel	2 µg	7	CED	10	ELISA
Etanol	1%	7	CED	2	ELISA
Rapamicina	2 µg	7	CED	6	Supervivencia
Etanol	10%	7	CED	6	Supervivencia

Resultados

4.2.2. Detección de pS6 in vivo por inmunohistoquímica tras la administración de los fármacos mediante CED

Una vez determinada la concentración máxima tolerada de rapamicina y torisel, 22 ratas con tumores intracraneales U87MG fueron tratadas con 100 µg/ml del fármaco: 10 con rapamicina, 10 con torisel y 2 controles (Tabla 4.2). Las ratas fueron sacrificadas los días 1, 2, 3, 4 y 5 después del tratamiento para analizar el nivel de fosforilación de la proteína S6 (Fig. 4.13 y 4.14).

La proteína S6 fosforilada se encontró abundantemente expresada en los



Resultados

Fig. 4.11 Estudio de la toxicidad de la rapamicina a diferentes concentraciones suministrada localmente mediante CED (tinción hematoxilina y eosina). En el hemisferio derecho se administró rapamicina a la concentración indicada, mientras que en el hemisferio izquierdo se inyectó el vehículo equivalente.

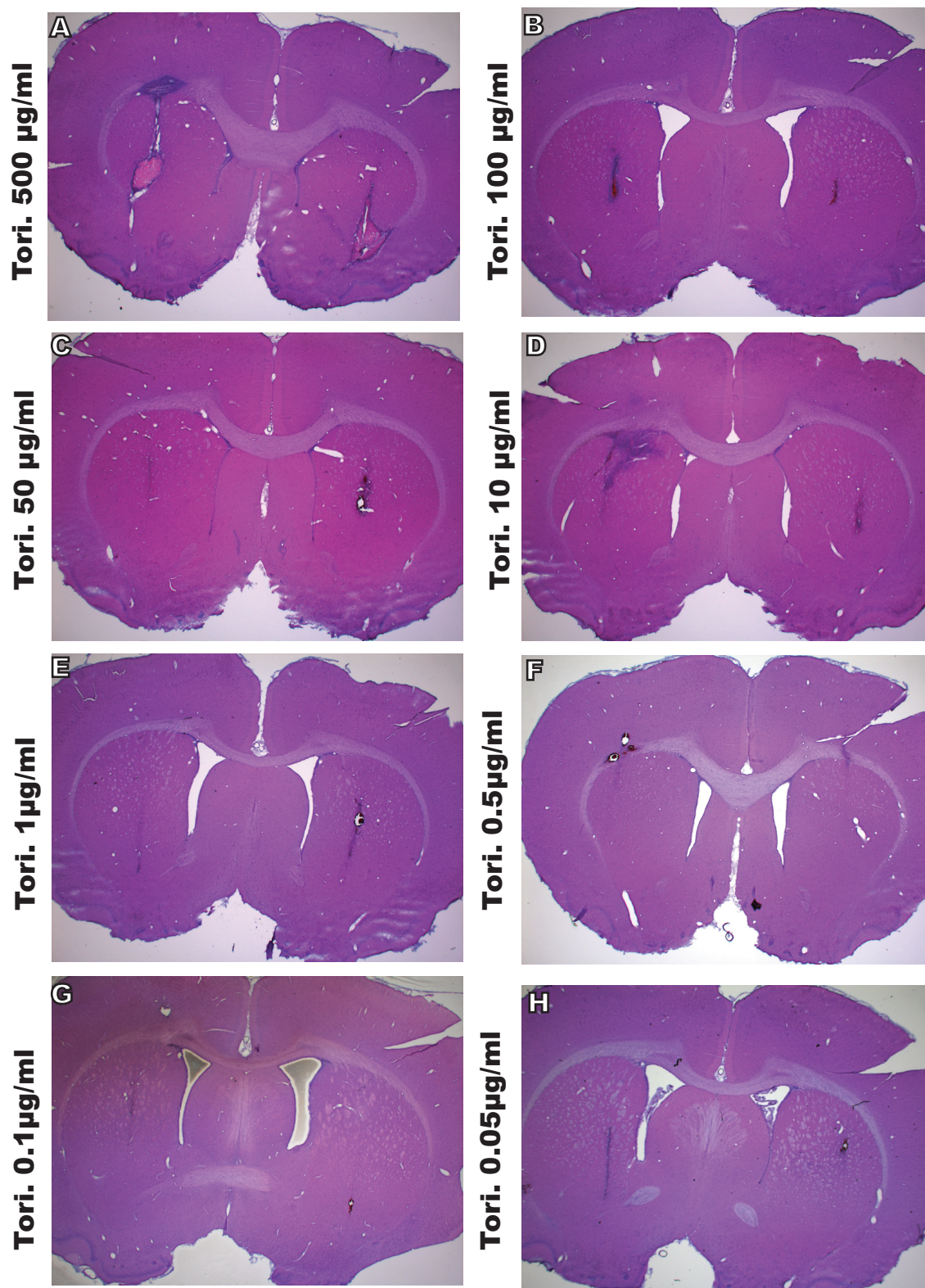


Fig. 4.12 Estudio de toxicidad del torisel a diferentes concentraciones suministrado localmente mediante CED (tinción hematoxilina y eosina). En el hemisferio derecho se administró torisel a la concentración indicada, mientras que en el hemisferio izquierdo se inyectó el vehículo equivalente.

tumores U87MG de las ratas control (Fig. 4.14.K). Al analizar los cerebros tratados con rapamicina a los 1, 2, 3, 4, y 5 días se encontró también una alta expresión de la proteína S6 fosforilada (Fig. 4.14.A-E) a excepción de una pequeña zona de inhibición de la fosforilación 1 día después del tratamiento con rapamicina (Fig. 4.13.A-C). En el caso del tratamiento con torisel se detectaron altos niveles de pS6 a todos los tiempos analizados (Fig. 4.14.F-J).

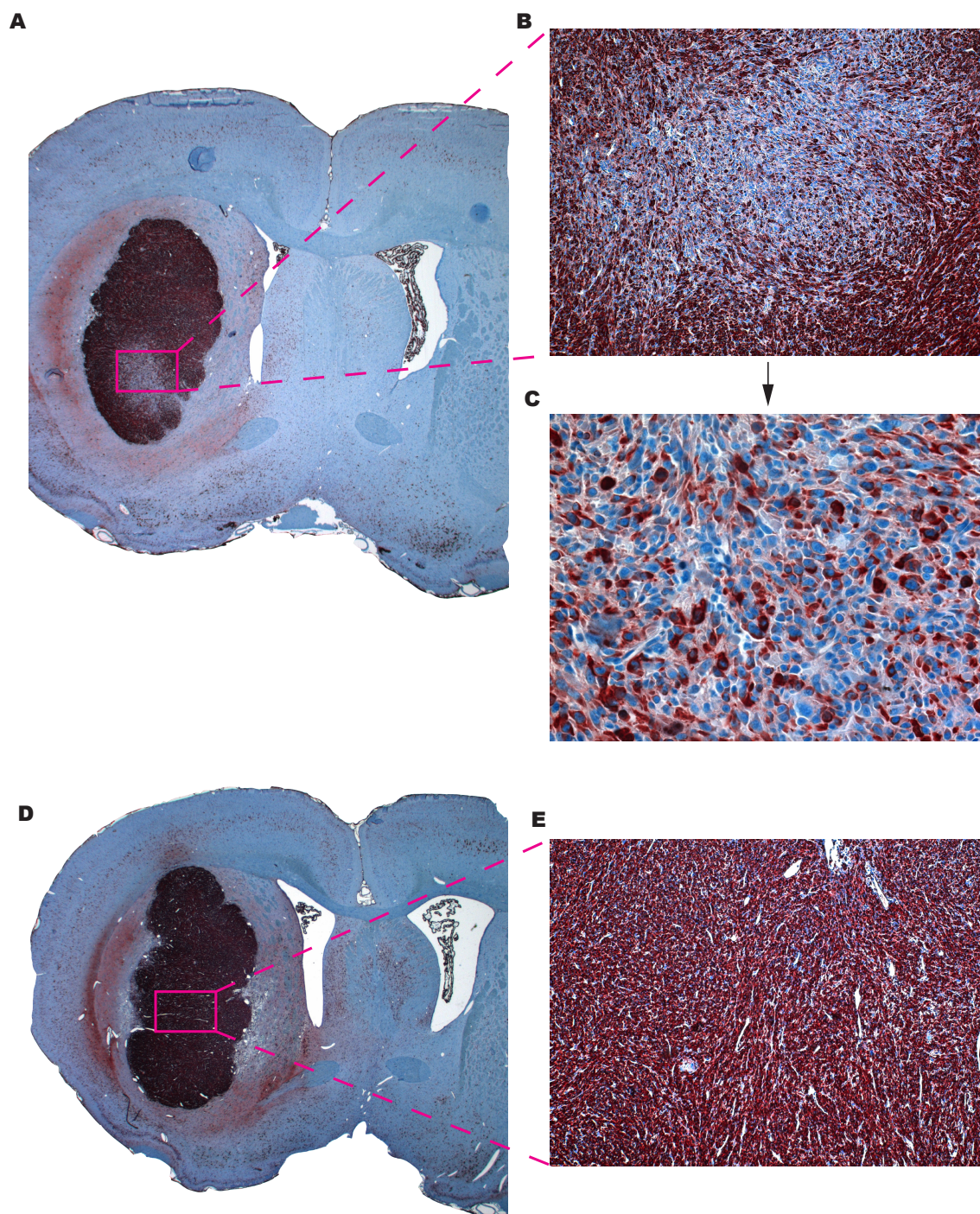


Fig. 4.13 Detalle del análisis inmunohistoquímico de la fosforilación de S6 en tumores generados por U87MG. (A) Tumor después de 1 día de tratamiento que presenta una zona sin señal de pS6. (B) 10x (C) 40x. (D) Cerebro después de 2 días de tratamiento, (E) 10x.

No se observó, por tanto, un cambio considerable en el estado de activación de la vía de mTOR al administrar rapamicina o torisel mediante CED en tumores intracraneales U87MG.

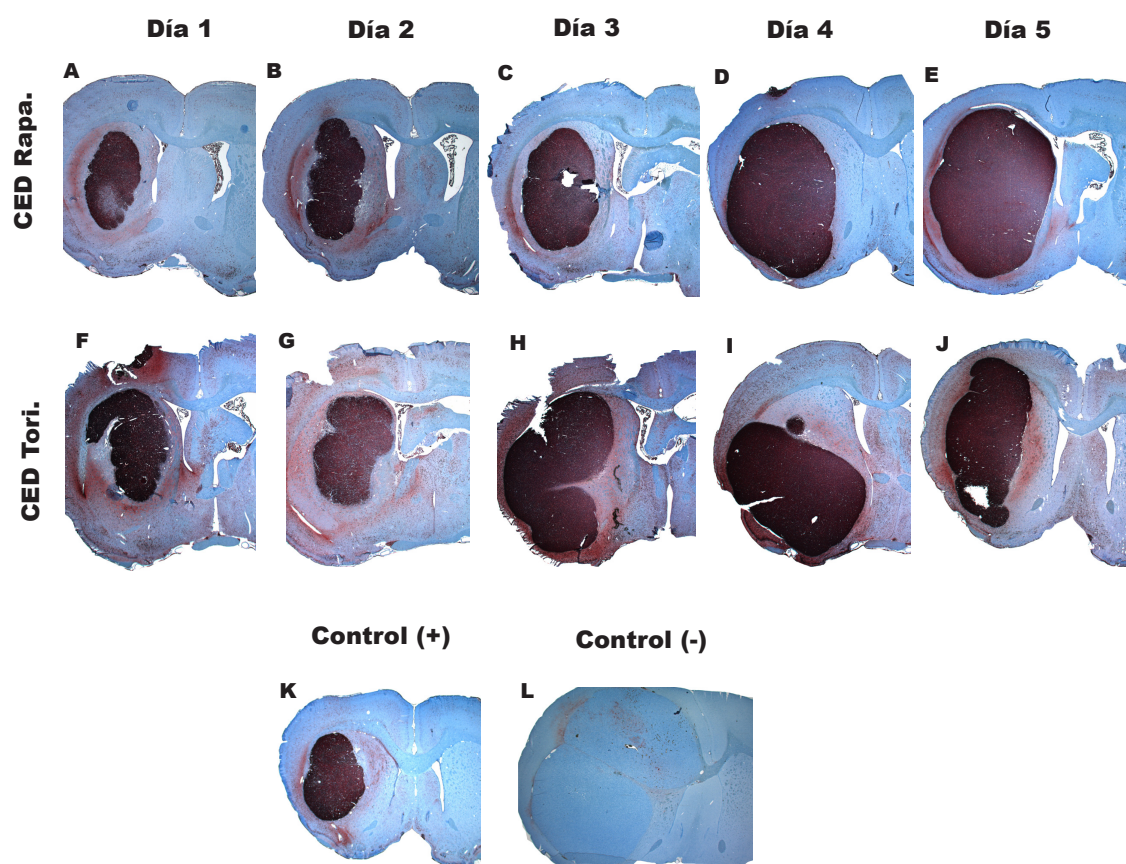


Fig. 4.14 Detección inmunohistoquímica de pS6 en tumores generados por la línea U87MG. (A-E) Tumores tratados con 100 µg/ml de rapamicina (días 1, 2, 3, 4 y 5 después de la instilación mediante CED). (F-J) Tumores tratados con 100 µg/ml de torisel (días 1, 2, 3, 4 y 5 después de la instilación mediante CED). (K) Control positivo y (L) negativo para la tinción de la pS6.

4.2.3. Detección de pS6 in vivo mediante ELISA tras la administración de los fármacos mediante CED

Con la intención de cuantificar los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica, 22 ratas con tumores intracraneales U87MG fueron tratadas con una dosis de 100 µg/ml: 10 ratas con rapamicina, 10 ratas con torisel y 2 ratas control (Tabla 4.2). Las ratas fueron sacrificadas los días 1, 2, 3, 4, y 5 después del tratamiento para analizar la fosforilación de la proteína S6, al igual que se hizo en el estudio de IHC (Fig. 4.15).

Los niveles de pS6 detectados en los tumores no variaron con respecto a los cerebros control en las ratas tratadas con rapamicina (Fig. 4.15.A) o torisel (Fig. 4.15.B). La expresión de la pS6 se mantuvo al mismo nivel que el control a lo largo de los cinco días tras el tratamiento con cualquiera de los dos compuestos.

La conclusión fue que no se observó ninguna reducción en el nivel de fosforilación de pS6 al tratar a los animales xenotransplantados con rapamicina o torisel mediante CED.

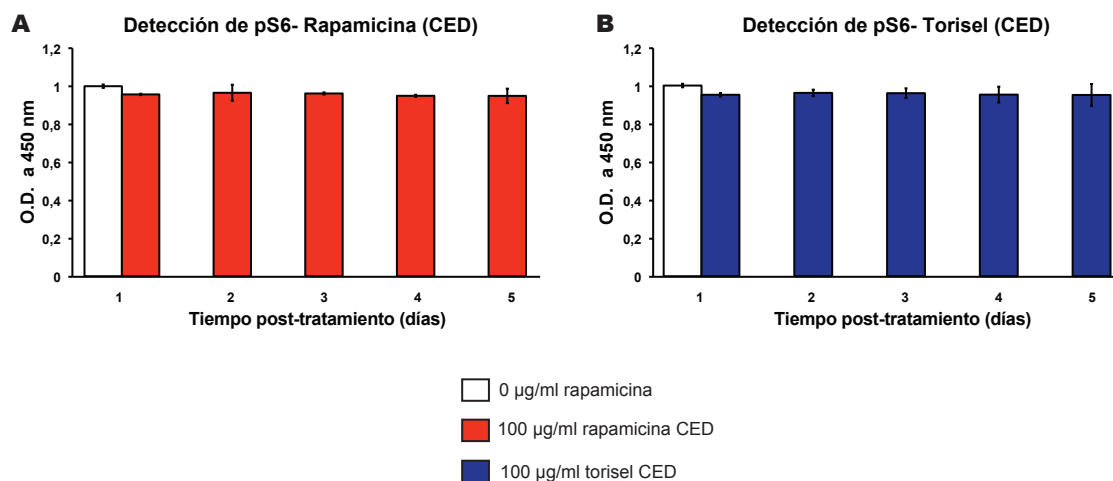


Fig. 4.15 Ensayo de ELISA para cuantificar el nivel de fosforilación de S6 en tumores U87MG 1, 2, 3, 4 y 5 días después de la CED. (A) Animales tratados con 100 µg/ml de rapamicina 1, 2, 3, 4 y 5 días después de la CED. (B) Animales tratados con 100 µg/ml de torisel 1, 2, 3, 4 y 5 días después de la CED.

Resultados

4.2.4. Toxicidad sistémica

Realizamos un ensayo de supervivencia con animales xenotransplantados ortotópicamente con células U87MG y tratados mediante CED con rapamicina (100µg/ml) (Tabla 4.2). Se llevó a cabo el seguimiento de los signos de toxicidad durante el curso del tratamiento.

En contraste con los animales tratados con inyección intraperitoneal de rapamicina o torisel, no se produjo pérdida de pelo en ninguno de los animales tratados mediante CED con rapamicina.

El peso de los animales fue también registrado como un síntoma de la toxicidad de los fármacos, (Fig. 4.16.A). Todos los animales sufrieron una pérdida de peso tras la implantación del tumor, que fue menor del 1.1 % respecto a su peso original. Cuando los animales recibieron rapamicina mediante CED no sufrieron ninguna disminución de su peso, sugiriendo que el proceso quirúrgico no afectó a los animales, de hecho ganaron aproximadamente un 5.0% de peso en los días posteriores al tratamiento con CED.

Todos los animales sufrieron una disminución de peso aproximadamente del 9.3 %, en el momento de su muerte probablemente debido al tumor.

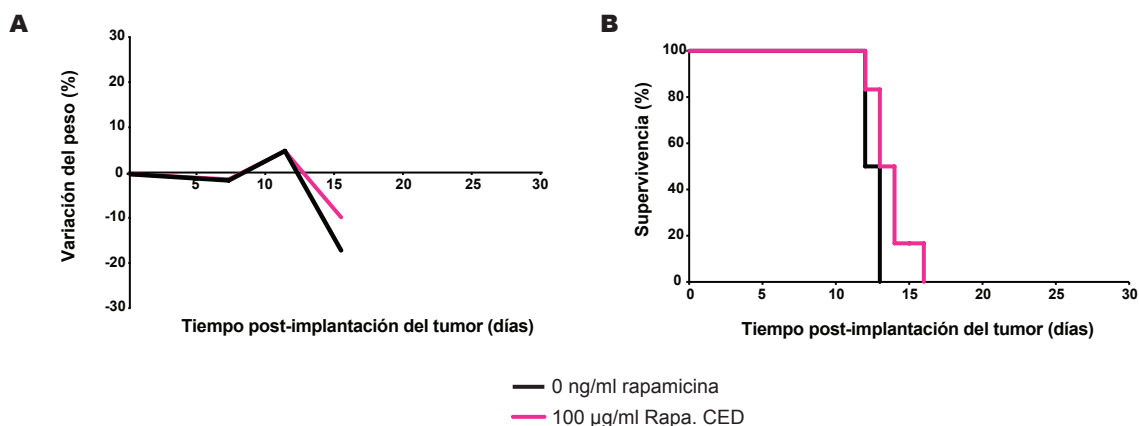


Fig. 4.16 Estudio de supervivencia con animales xenotransplantados con células U87MG y tratados con 100 µg/ml de rapamicina mediante CED. (A) Evolución del peso de los animales tras el implante del tumor (B) Gráfica Kaplan-Meier mostrando la supervivencia de los animales frente al control.

4.2.5. Supervivencia de animales xenotransplantados ortotópicamente con U87MG y tratados con rapamicina mediante CED

Se realizó un estudio de supervivencia en animales con tumores intracraneales U87MG tratados por CED con rapamicina (100 µg/ml), 7 días después del implante de las células tumorales (Fig. 4.16.B) (Tabla 4.2).

Doce ratas atímicas recibieron la implantación de células tumorales U87MG en el estriado y fueron divididas aleatoriamente en dos grupos. Siete días después de la implantación del tumor, las ratas recibieron el tratamiento de 100 µg/ml de rapamicina, o el vehículo mediante CED.

Entre los días 12 y 13, todas las ratas control desarrollaron síntomas neurológicos debidos a la presencia de tumores intracraneales de gran tamaño, posteriormente confirmados por los estudios histológicos (MS= 12,5 días).

Los animales tratados con 100 µg/ml de rapamicina administrado mediante CED murieron en torno a los días 12-16 (MS= 13,67 días; P= 0,373). No se observó un incremento de la supervivencia asociada a este tratamiento.

La evaluación histopatológica del tejido cerebral fue realizada en todos los animales después de su fallecimiento. Los animales que mostraron síntomas evidentes de progresión del tumor fueron sacrificados. En todos los casos se apreció la progresión del tumor.

4.3. Efecto de la rapamicina en células troncales tumorales derivadas de GBM humanos in vitro e in vivo mediante xenotransplantes ortotópico

Se analizó el efecto que produce la rapamicina en células troncales tumorales (CSCs) derivadas de GBMs humanos. Previamente en nuestro laboratorio se derivaron cultivos enriquecidos en CSCs a partir de piezas de exéresis quirúrgica de dos pacientes denominados CSCs-5 y CSCs-7. Se observó que las células eran capaces de autorrenovarse y proliferar a largo plazo como neuroesferas, expresando los marcadores de células troncales neurales: CD133, nestina, Sox2, vimentina y nucleostemina. Las CSCs-5 y CSCs-7 son multipotentes, como demuestra su capacidad de originar, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, tras 12 días en condiciones de diferenciación.

Una vez que los cultivos de CSCs-5 y CSCs-7 fueron establecidos y caracterizados por Jon Gil, se realizaron experimentos in vitro para estudiar el efecto de la rapamicina en proliferación, muerte celular, expresión de CD133, habilidad para generar colonias en agar blando y la inhibición de la vía de mTOR. Asimismo se valoró el efecto de la rapamicina en xenotransplantes ortotópicos de la línea celular CSCs-5.

4.3.1. Efecto de la rapamicina en la proliferación de las CSCs

Se estudió el efecto de la rapamicina en el crecimiento celular de las líneas CSCs-5 y CSCs-7, y se comparó con las líneas celulares establecidas de GBM humano: U87MG y U251MG.

Resultados

El etanol, a las concentraciones empleadas para disolver la rapamicina, no parece causar ninguna citotoxicidad a las células CSCs-5, CSCs-7, U87MG y U251MG. El suministro de rapamicina, como ha sido explicado previamente, no muestra un efecto citotóxico en las líneas celulares U87MG y U251MG pero sí tiene un efecto citostático. Cuando se administró rapamicina a las células U87MG, el crecimiento celular a 24 horas se redujo al 92,0% y 90,7% (para 2,5 y 1000 ng/ml respectivamente). A 48 horas de añadir rapamicina, el crecimiento celular se redujo al 77,7% y 73,2%, (para 2,5 ng/ml y 1000 ng/ml respectivamente). Pasadas 72 horas de la adición del fármaco, el crecimiento celular no varió significativamente con respecto de las 48 horas, resultando en tasas de crecimiento de 73,4% y 65,7% respecto el control, (Fig. 4.17.A).

Los resultados fueron diferentes cuando se utilizó rapamicina en células U251MG. Estas células, examinadas a 24 horas del tratamiento con rapamicina, no mostraron una diferencia significativa con respecto a las células control. A 48 horas del tratamiento el fármaco comenzó a tener efecto en el crecimiento celular, reduciéndolo a 98,2% y 90,8% (para 2,5 y 1000 ng/ml respectivamente). A las 72 horas del tratamiento con rapamicina, el crecimiento celular se redujo respecto al control a 98,7% y 80,2% (Fig. 4.17.B).

El efecto citostático fue menor para las células U251MG que para las U87MG. Pero en ambas líneas celulares, se observó una inhibición del crecimiento celular. Las células CSCs-5 y CSCs-7 tratadas con 2,5 ó 1000 ng/ml de rapamicina mostraron un

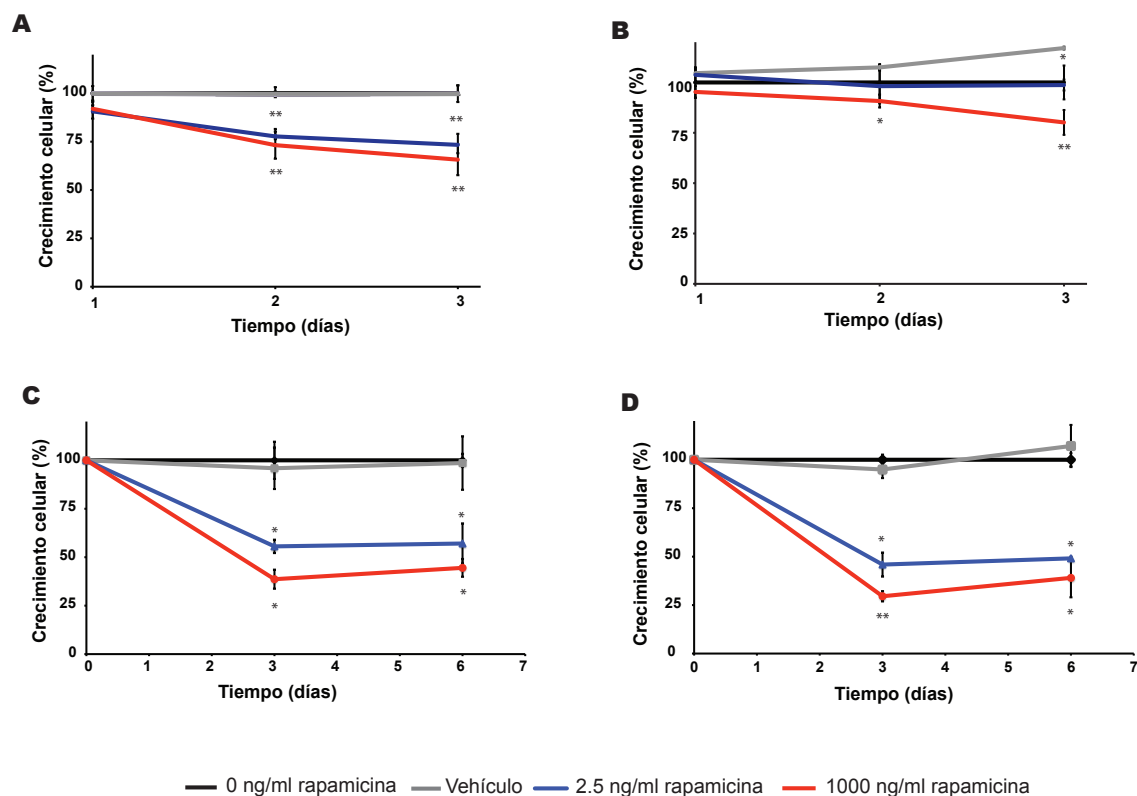


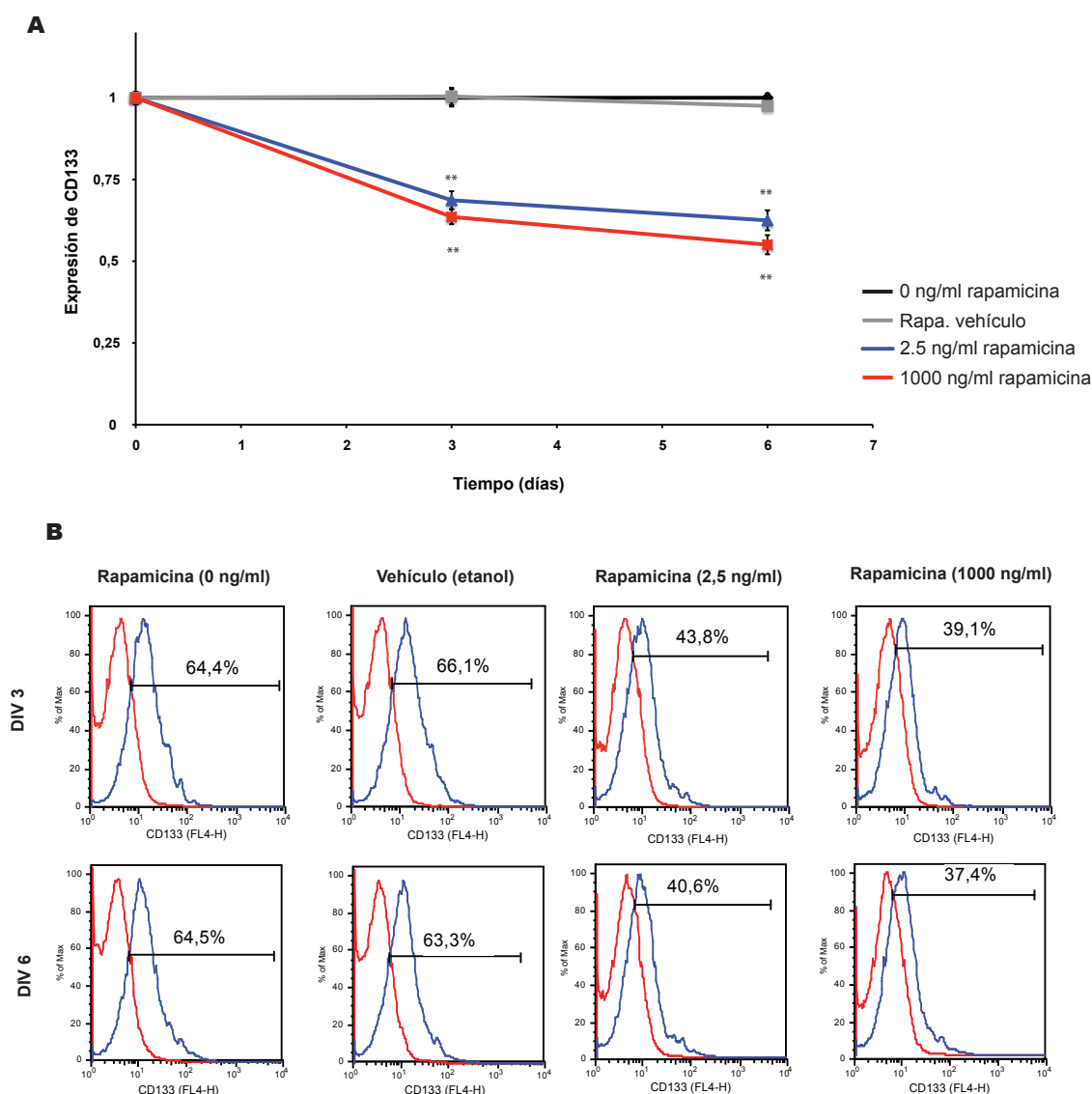
Fig. 4.17 Efecto de la rapamicina a diferentes concentraciones, en la proliferación de: (A) U87MG, (B) U251MG, (C) CSCs-5 y (D) CSCs-7. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$.

Resultados

profundo efecto en el crecimiento celular disminuyéndolo en un 50%, (Fig. 4.17.C y Fig. 4.17.D).

Cuando la rapamicina fue suministrada a las células CSCs-5, el crecimiento celular a día 3 se redujo al 56% y 39% para 2,5 y 1000 ng/ml respectivamente. En la última medida, tomada a día 6, el crecimiento celular no mostró un cambio significativo con respecto a los resultados obtenidos a día 3, proporcionando resultados de crecimiento celular de 57% y 45% respecto el control (Fig. 4.17.C). Existe una tendencia a la diferencia, aunque no es significativa, en el crecimiento celular entre las células tratadas con 2,5 o 1000 ng/ml, y esta diferencia tiende a desaparecer con el tiempo.

Los resultados fueron muy similares cuando se utilizó rapamicina en las células CSCs-7. Estas células tratadas durante 3 días con rapamicina presentan una diferencia significativa con las células control, el crecimiento celular se redujo hasta el 46% y 30% para 2,5 ng/ml y 1000 ng/ml respectivamente. A día 6 el efecto del tratamiento en el crecimiento celular no cambió con respecto a día 3, proporcionando un crecimiento celular del 49% y 39%, (Fig. 4.17.D). Al igual que con las células CSCs-5, se aprecia una tendencia a la diferencia, aunque no es significativa, en el crecimiento celular entre las células tratadas con 2,5 ó 1000 ng/ml, y esta diferencia tiende a desaparecer con el tiempo.



Resultados

Fig. 4.18 (A) Efecto que produce la rapamicina en la expresión de CD133 en CSCs-5 a diferentes concentraciones: 0 ng/ml; vehículo; 2,5 ng/ml y 1000 ng/ml. (B) Las gráficas muestran valores representativos de la expresión de CD133 en CSCs-5, tras 3 días de tratamiento con rapamicina. (**) $p < 0,001$.

4.3.2. Efecto de la rapamicina en la expresión de CD133

Se analizó el efecto de la rapamicina en la expresión de el marcador de célula troncal CD133 en las células CSCs-5 y CSCs-7 encontrándose un importante efecto de disminución de la expresión de CD133 para las células CSCs-5 y CSCs-7 (Fig. 4.18 y Fig. 4.19).

A día 3, la población de CD133⁺ en la muestra control fue de 64,13% frente a 44,0% para 2,5 ng/ml de rapamicina y 40,8% para 1000 ng/ml de rapamicina. Los resultados a día 6 no cambiaron sustancialmente con respecto a los del día 3; mostrando concentraciones en las células control del 64,0% y del 40,0%, 35,2% para 2,5 y 1000 ng/ml respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD133 para las dos concentraciones de rapamicina (2,5 y 1000 ng/ml) (Fig. 4.18.A).

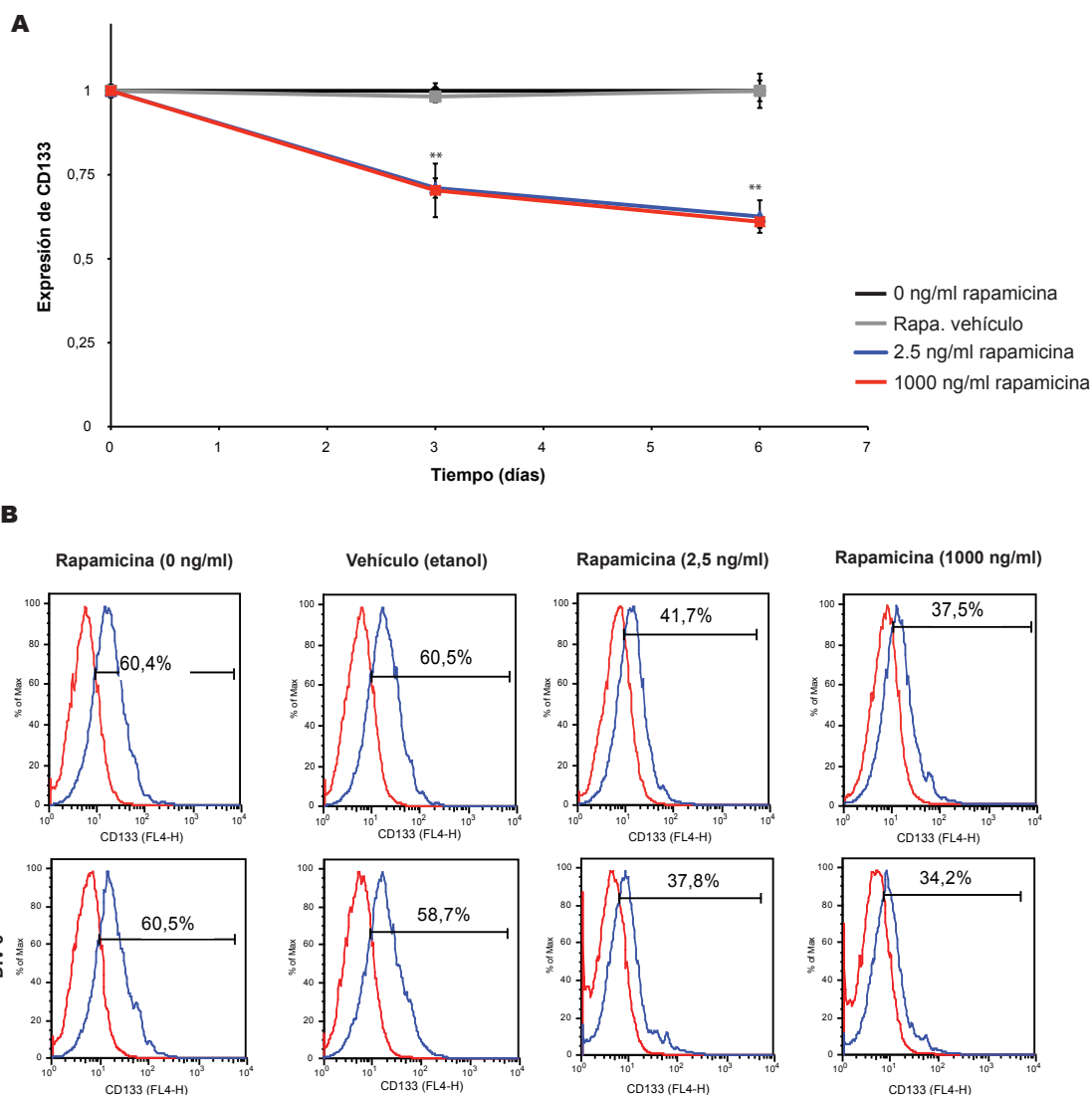


Fig. 4.19 (A) Efecto de la rapamicina en la expresión de CD133 en CSCs-7 a diferentes concentraciones: 0 ng/ml; vehículo; 2,5 ng/ml y 1000 ng/ml. (B) Las gráficas muestran valores representativos de la expresión de CD133 en CSCs-7, tras 3 días de tratamiento con rapamicina. (**) $p < 0,001$.

Las gráficas (Fig. 4.18.B) muestran valores representativos de la expresión de CD133 después del tratamiento con rapamicina durante 3 o 6 días.

También se analizó el efecto de la rapamicina en la expresión de CD133 en las células CSCs-7. Al igual que con las células CSCs-5, se encontró una población de CD133⁺ significativamente disminuida con respecto a las células control ($p < 0,001$), (Fig. 4.19). A día 3, la población de CD133⁺ del control fue de 60,93% frente a 43,3% para 2,5 ng/ml de rapamicina y 37,3% para 1000 ng/ml de rapamicina. Los resultados a día 6 mostraron una ligera variación con respecto a los resultados a día 3. En las células CSCs-7 se encontró un porcentaje de células CD133⁺ del 59,7%. Valores de 37,3% y 36,4% se obtuvieron para 2,5 y 1000 ng/ml respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD133⁺ para las dos concentraciones de rapamicina (2,5 y 1000 ng/ml) (Fig. 4.19.A). Las gráficas muestran perfiles representativos de la expresión de CD133 después del tratamiento con rapamicina durante 3 ó 6 días (Fig. 4.19.B).

4.3.3. Efecto de la rapamicina en la capacidad de formación de colonias en agar blando

Se empleó el ensayo de agar blando para estimar el potencial tumorigénico de las células CSCs-5 y CSCs-7 tratadas con 2,5 ó 1000 ng/ml de rapamicina (Fig. 4.20 y 4.21). Se sembraron células CSCs-5 en agar blando al 0,35% con distintas cantidades de rapamicina: control, vehículo, 2,5 ng/ml o 1000 ng/ml de rapamicina. Catorce días después de sembrar las células, las colonias viables resultantes fueron teñidas con MTT y fotografiadas. Sobre la imagen en escala de grises se aplicó una tabla de color, utilizando el software ImageJ, para cuantificar el número e intensidad de las colonias en distintas condiciones mediante una barra de calibración. Se estableció un umbral de un mínimo de 10 píxeles para considerar un evento como colonia (Fig. 4.20).

Se observó que al añadir el vehículo al agar, la generación de colonias fue igual a la del control; por lo que el vehículo no afectó la capacidad de las células CSCs-5 de formar colonias.

La adición de rapamicina a las células CSCs-5, produce un descenso notable en la formación de colonias. Cuando se administraron 2,5 ng/ml en el cultivo semisólido, la capacidad de generar colonias descendió de forma no significativa con respecto al control (100% para el control vs. 76,32% para 2,5 ng/ml de rapamicina). Sin embargo, al añadir 1000 ng/ml de rapamicina al cultivo se observó un cambio drástico en la capacidad de formar colonias con respecto al control (100% control vs. 4,91% para 1000 ng/ml, $p < 0,001$) (Fig. 4.20.B).

Resultados

El mismo experimento fue realizado con las células CSCs-7. Al igual que ocurrió con las células CSCs-5, el vehículo no afecta la capacidad de formar colonias de las células CSCs-7. Al añadir rapamicina la capacidad de generar colonias de las células CSCs-7 descendió (Fig. 4.21). La concentración de 2,5 ng/ml de rapamicina redujo algo la capacidad de generar colonias (77,41%) con respecto al control (100%). Pero una mayor concentración de rapamicina, 1000 ng/ml, redujo sustancialmente la capacidad de formar colonias (13,47%) frente al control (100%), $p < 0,05$, (Fig. 4.21.B).

4.3.4. Efecto de la rapamicina en el estado de fosforilación de S6 y Akt en líneas establecidas CSCs in vitro

En condiciones de proliferación, mTOR fosforila la quinasa p70S6 que, a su vez, fosforila la proteína ribosómica S6. Se analizó el efecto que produce la rapamicina en U87MG, CSCs-5 y CSCs-7 sobre la vía de mTOR mediante western blot para pS6, S6, pAkt y Akt.

La proteína ribosómica S6 se encuentra altamente fosforilada en las células U87MG (Fig. 4.22.A). Después del tratamiento con el vehículo no se observaron cambios en la detección de la pS6 (Fig. 4.22.A). Dos y tres días después del tratamiento con 2,5 ng/ml ó 1000 ng/ml de rapamicina se observó una disminución de los niveles de pS6 (Fig. 4.22.A), indicando que la inhibición se mantiene al menos 72 horas.

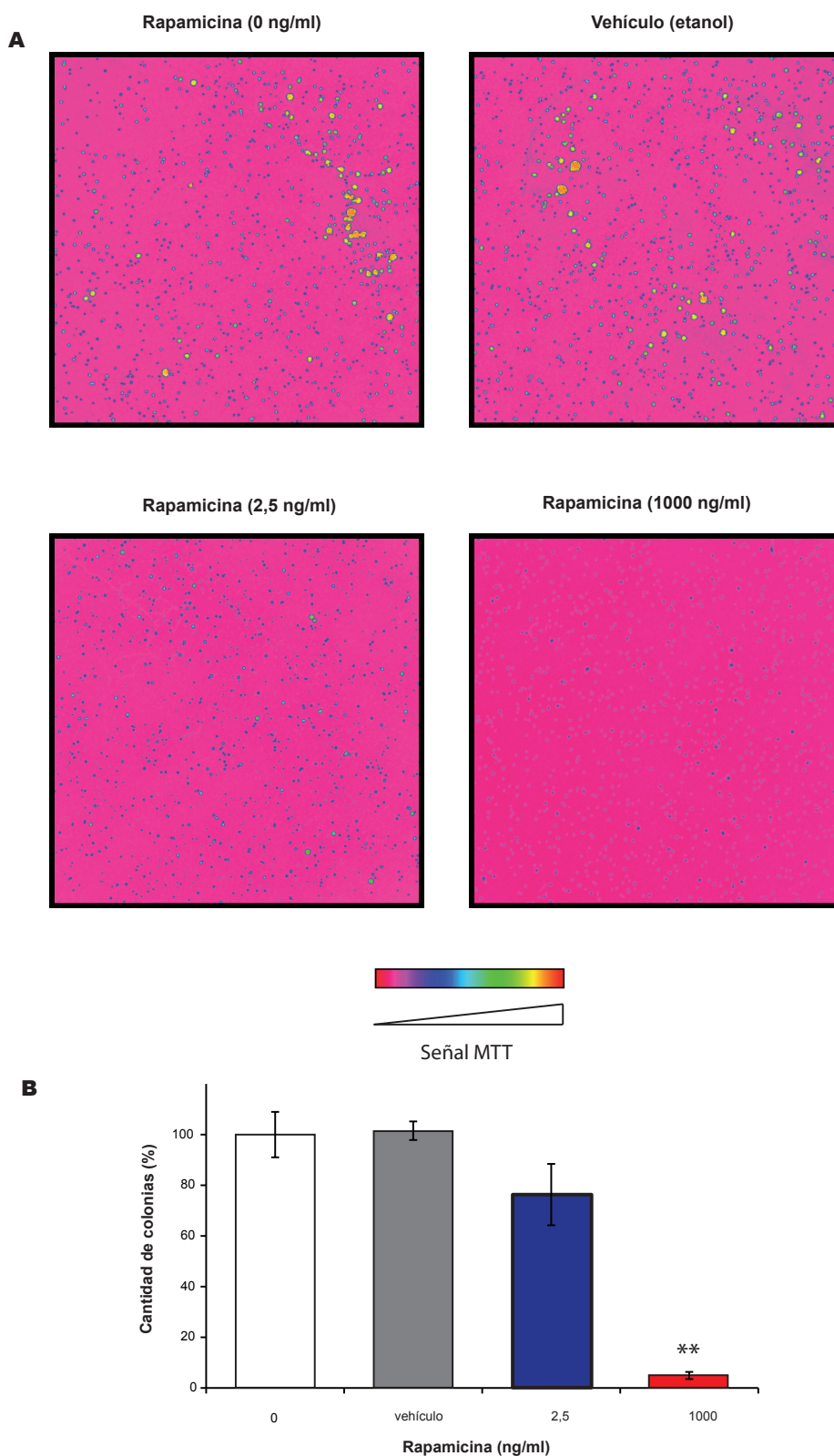


Fig. 4.20 Efecto de la rapamicina en la capacidad de formación de colonias de CSCs-5 sembradas en agar blando. (A) Colonias de CSCs-5 formadas después de 14 días de incubación en agar blando al 0,35% en ausencia o presencia de distintas cantidades de rapamicina. Las colonias se tiñeron con MTT y fueron fotografiadas. (B) Análisis cuantitativo del número de colonias formadas por CSCs-5 para cada condición: 0; vehículo; 2.5 ng/ml y 1000 ng/ml. (**) $p < 0,001$

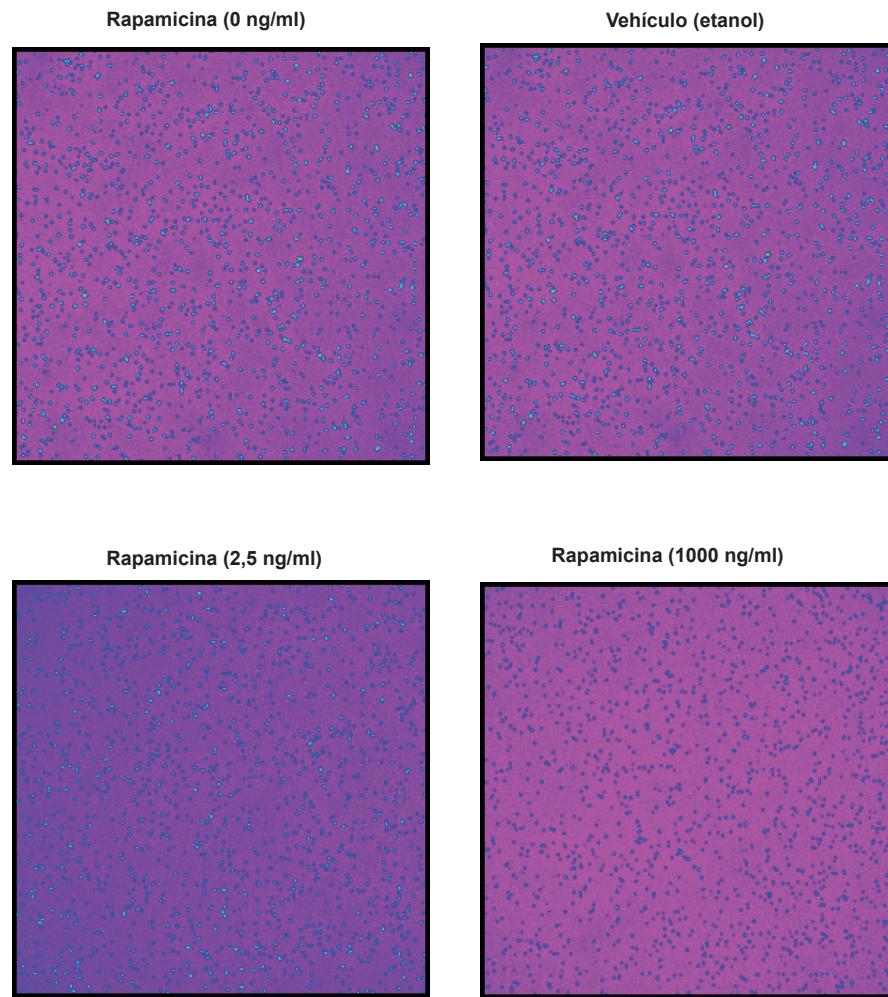
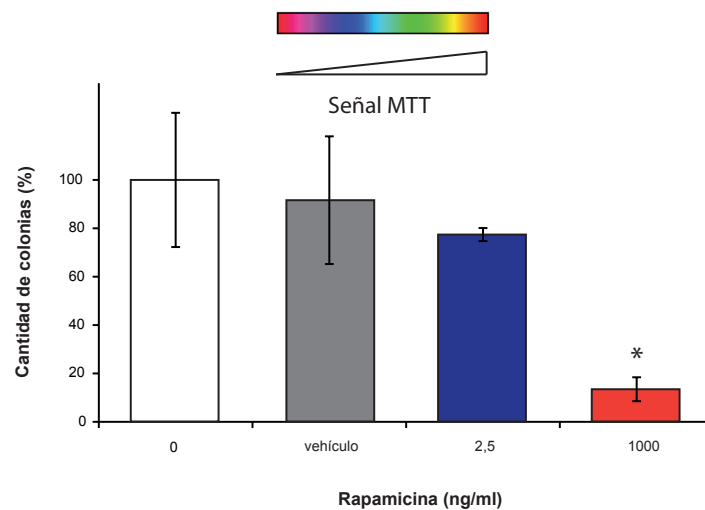
A**Resultados****B**

Fig. 4.21 Efecto de la rapamicina en la capacidad de formación de colonias de CSCs-7 sembradas en agar blando. (A) Colonias de CSCs-7 formadas después de 14 días de incubación en agar blando al 0,35% en ausencia o presencia de distintas cantidades de rapamicina. Las colonias se tiñeron con MTT y fueron fotografiadas. B) Análisis cuantitativo del número de colonias formadas por CSCs-7 para cada condición: 0; vehículo; 2.5 ng/ml y 1000 ng/ml. (**) $p < 0,001$.

El análisis de la proteína pS6 en las células CSCs-5 y CSCs-7 originó resultados equivalentes. Mediante el western blot para la proteína S6 fosforilada en células CSCs-5 tratadas con 2,5 ng/ml o 1000 ng/ml de rapamicina se detectó la inhibición total de la fosforilación de la proteína S6 tres días después de la administración del fármaco. Una inhibición similar se apreció en las células CSCs-5 en las mismas condiciones 6 días después del suministro del fármaco (Fig. 4.22.B).

También se encontraron altos niveles de fosforilación de la proteína S6 en las células CSCs-7 (Fig. 4.22.C). Después de suministrar el vehículo, no se apreciaron cambios en la expresión de la pS6. Tres días después del tratamiento con 2,5 ng/ml ó 1000 ng/ml de rapamicina se observó un fuerte descenso en la fosforilación de S6. Al analizar el efecto tras 6 días de la administración del fármaco, la inhibición en la fosforilación de S6 se mantuvo intacta (Fig. 4.22.C).

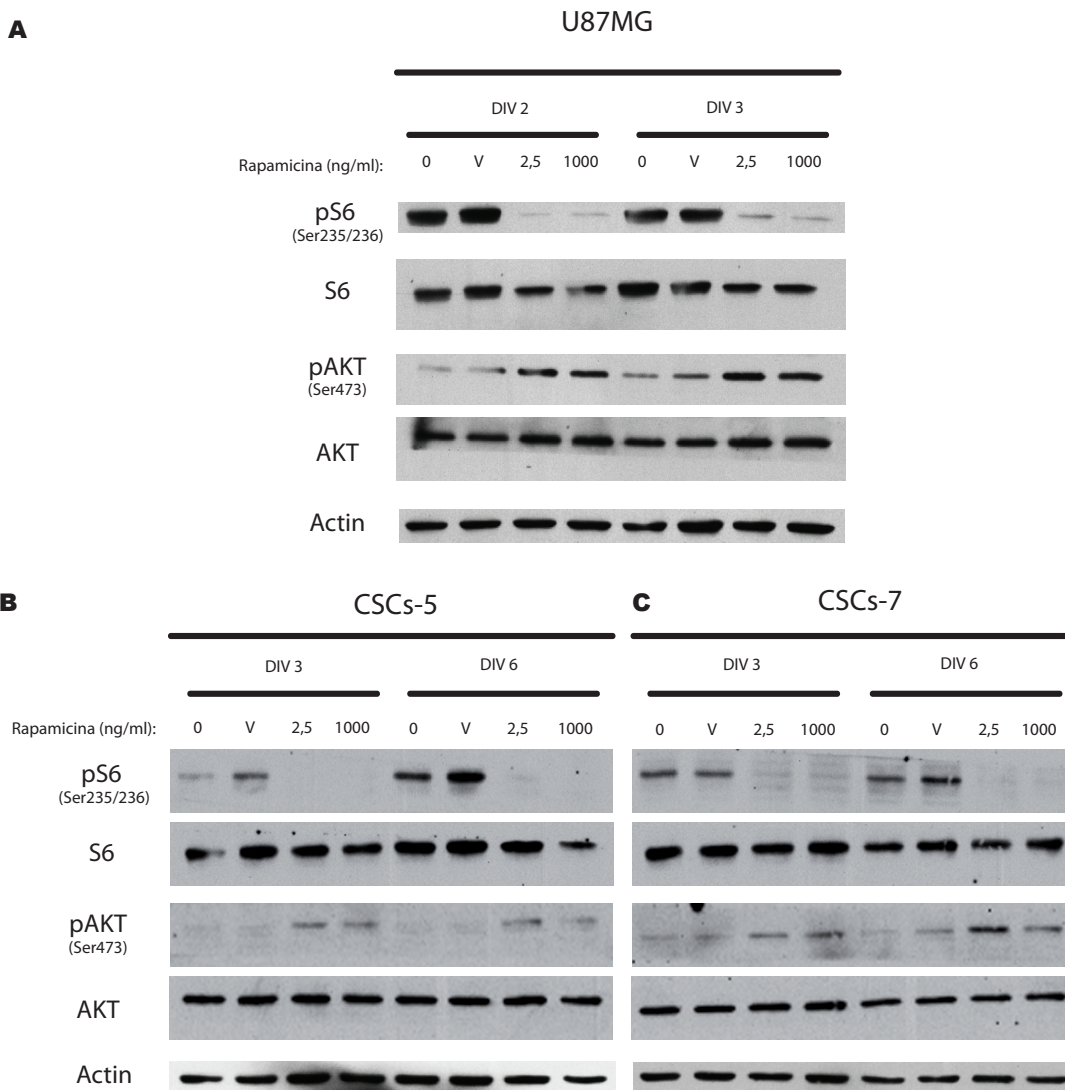


Fig. 4.22 Análisis de de los niveles totales y fosforilados de la proteína ribosómica S6 y la quinasa Akt mediante western blot en presencia de 0 ng/ml; vehículo; 2,5 ó 1000 ng/ml de rapamicina en: (A) U87MG, (B) CSCs-5 y (C) CSCs-7. DIV2= día 2; DIV3= día 3, DIV6= día 6.

Los niveles totales de proteína S6 se mantuvieron sin cambios en U87MG, CSCs-5 y CSCs-7 después del tratamiento con rapamicina.

También se evaluó el efecto de la rapamicina en la quinasa Akt, perteneciente a la vía de señalización pre-mTOR, en las tres líneas celulares: U87MG, CSCs-5 y CSCs-7.

Las células U87MG control y tratadas con el vehículo presentaron niveles muy bajos de pAkt, mientras que se detectó un considerable aumento de la fosforilación de Akt en las células tratadas con 2,5 ng/ml ó 1000 ng/ml de rapamicina 2 días después de la administración del fármaco. La expresión de pAkt se vio incrementada en las células U87MG, tras tres días de tratamiento con 2,5 ó 1000 ng/ml de rapamicina (Fig. 4.22.A).

Las células CSCs-5 presentaron el mismo patrón de fosforilación de Akt que la línea U87MG detectándose mayores niveles tras 3 ó 6 días de la administración de 2,5 ó 1000 ng/ml de rapamicina, en comparación con las células control y tratadas con el vehículo (Fig. 4.22.B).

El análisis de la proteína pAkt en las células CSCs-7 tratadas con 2,5 ng/ml o 1000 ng/ml de rapamicina también mostró un incremento de la proteína pAkt a los 3 o 6 días del suministro del fármaco (Fig. 4.22.B).

Los niveles totales de Akt se mantuvieron estables en U87MG, CSCs-5 y CSCs-7 después del tratamiento con rapamicina.

4.3.5. Efecto de la rapamicina en la autorrenovación de las CSCs

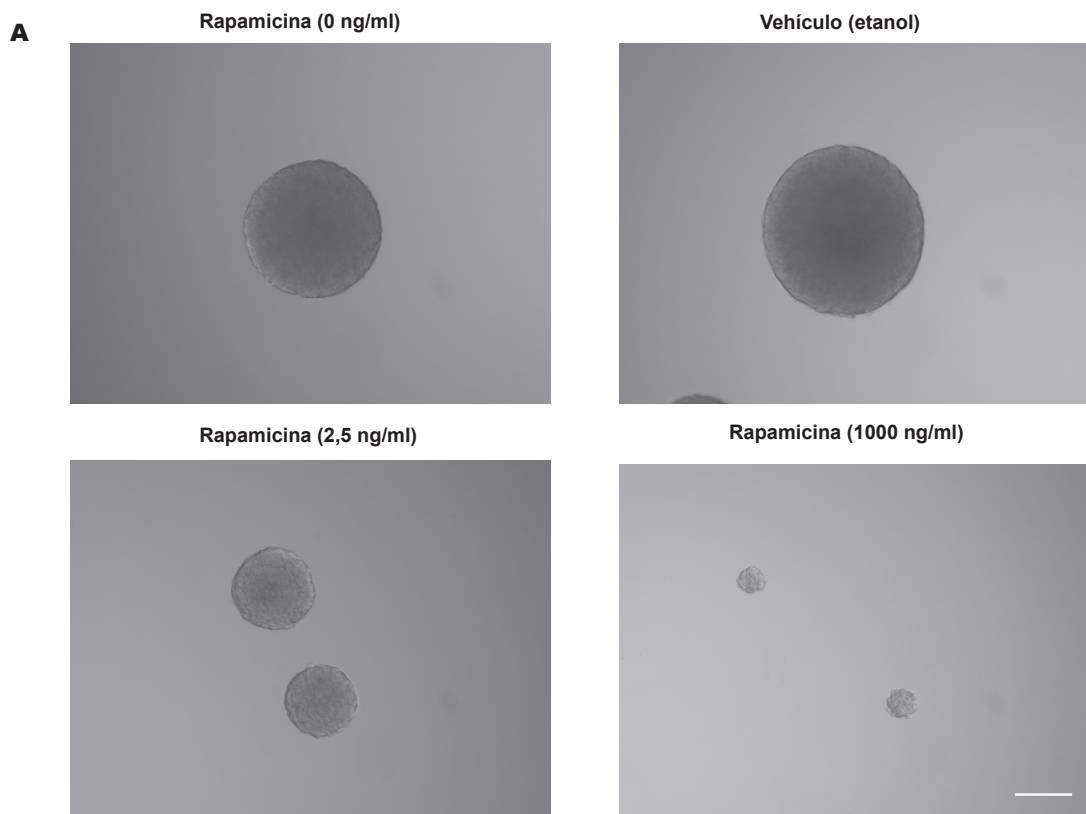
Resultados

Una aproximación in vitro para evaluar el potencial de autorrenovación de las células troncales consiste en realizar el ensayo de esferas secundarias. El método se basa en sembrar células pretratadas a baja densidad y analizar la formación de neuroesferas (Fig. 4.23.A).

Cuando se sembraron 1.000 células CSCs-5 por pocillo de placa M96 en presencia de medio control, fueron capaces de generar una media de 13,23 neuroesferas de entre 75 y 150 μm y 4,54 neuroesferas mayores de 150 μm . No se encontraron diferencias significativas cuando se administró el vehículo a las células (12,54 neuroesferas de 75-150 μm ; 5,18 neuroesferas mayores de 150 μm). La administración de 2,5 ng/ml de rapamicina generó una reducción significativa en la formación de las neuroesferas secundarias de mayor tamaño (15 neuroesferas de 75-150 μm ; 1,18 neuroesferas mayores que 150 μm , $p < 0,001$). Prácticamente se anuló la capacidad de formación de neuroesferas al añadir 1000 ng/ml de rapamicina, (0,47 neuroesferas de 75-150 μm , $p < 0,001$; 0 neuroesferas mayores que 150 μm , $p < 0,001$) (Fig. 4.23.B).

4.3.6. Monitorización del desarrollo de tumores intracraneales inducidos con U87MG y CSCs-5 mediante imágenes de resonancia magnética (MRI)

Se realizó un estudio de supervivencia en modelos de xenotransplantes ortotópico con U87MG y CSCs-5.



Resultados

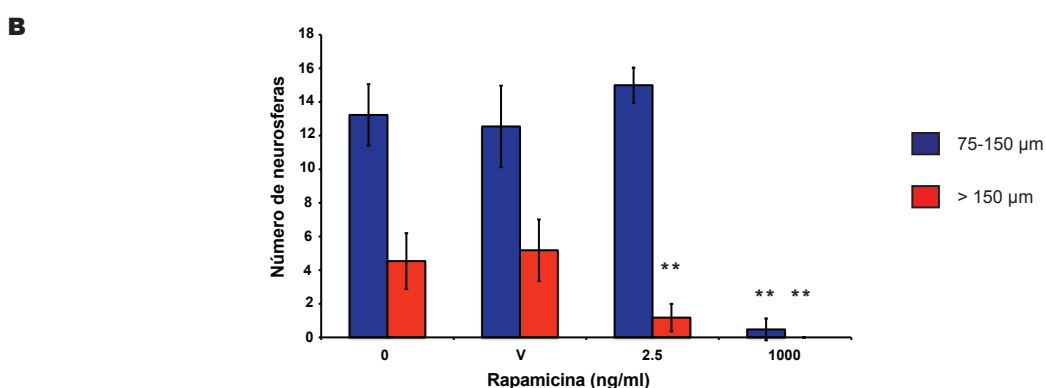


Fig. 4.23 Formación de neuroesferas secundarias de CSCs-5 después del tratamiento con rapamicina. (A) Imágenes representativas de las esferas secundarias formadas tras 14 días con: 0 ng/ml; vehículo; 2,5 o 1000 ng/ml de rapamicina. Barra de escala de 150 μ m. (B) Cuantificación del número de neuroesferas tras los diferentes tratamientos, con tamaño entre 75 y 150 μ m o mayores de 150 μ m. (**) $p < 0,001$.

Las ratas recibieron un implante de células tumorales U87MG o CSCs-5 en el estriado. Siete días después de la implantación de células U87MG se realizó una MRI para asegurar la existencia de tumor y para determinar con exactitud su localización una vez formado (Fig. 4.24.A). La figura presenta una vista axial del mismo animal con una diferencia de 1 mm de profundidad entre las dos imágenes. Se puede observar claramente la presencia de un tumor en todas las imágenes. El volumen del tumor U87MG existente al comienzo del tratamiento fue de media 41,065 mm³.

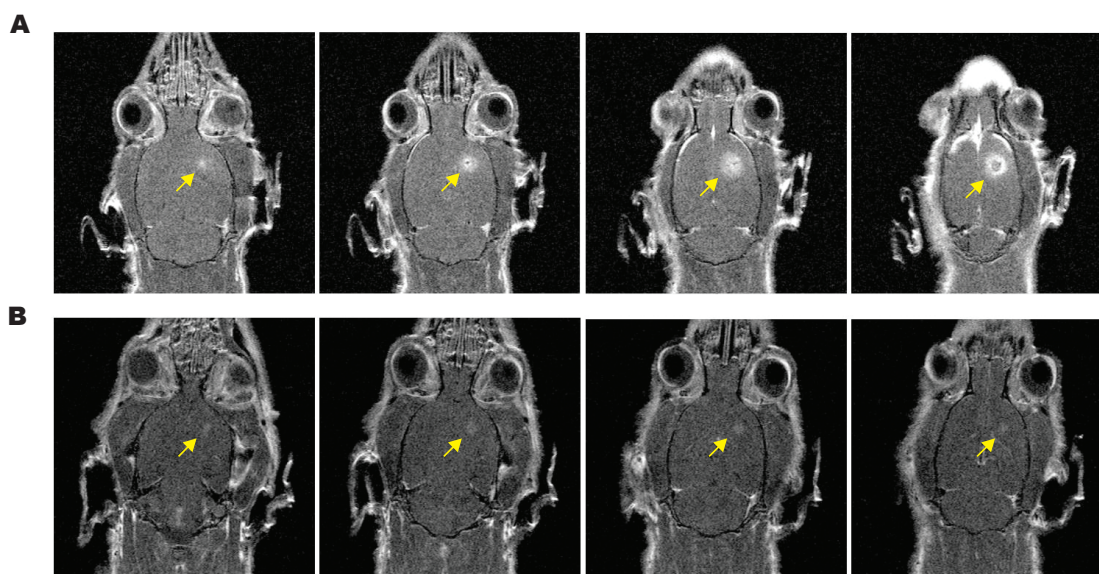


Fig. 4.24 Imágenes de resonancia magnética (MRI) de un animal representativo con un tumor generado (A) U87MG y (B) CSCs5, en el momento de comenzar el tratamiento. Los tumores aparecen como masas hiperintensas al ser visualizados en T1 con agente de contraste. Las distintas imágenes representan cortes consecutivos separados entre sí por 1 mm de profundidad.

También se analizó por MRI las ratas que recibieron el implante de células tumorales CSCs-5. Las imágenes MRI se tomaron 28 días después de la implantación de las células dado que estos tumores presentan un crecimiento más lento (Fig. 4.24.B). La imágenes axiales muestran tumores más pequeños que los de U87MG a los 7 días. El volumen medio de los tumores CSCs-5 al comienzo del tratamiento fue de 14,3 mm³.

Todos los animales utilizados en el estudio de supervivencia presentaron tumores cuando se realizó la MRI.

Resultados

4.3.7. Análisis de la toxicidad sistémica derivada del tratamiento

Se realizó un seguimiento de los animales utilizados en la evaluación de la eficacia antitumoral de la rapamicina, en búsqueda de posibles signos de toxicidad durante el curso del tratamiento. Este consistió en 1 dosis intraperitoneal de rapamicina (10 mg/kg) cada 7 días.

Todos los animales tratados con rapamicina perdieron el pelo en torno al día 15 después del comienzo del tratamiento.

La figura 4.25.A muestra la evolución del peso de animales con tumores de U87MG que recibieron el tratamiento descrito. Todos los animales sufrieron una pérdida de peso después de la implantación del tumor inferior al 7 % de su peso. Cuando los animales recibieron cada inyección intraperitoneal de rapamicina sufrieron una pérdida de peso de entre 0,63% y 10,49%. Como los animales recibieron rapamicina cada 7 días, fueron capaces de recuperar peso antes de cada nueva inyección.

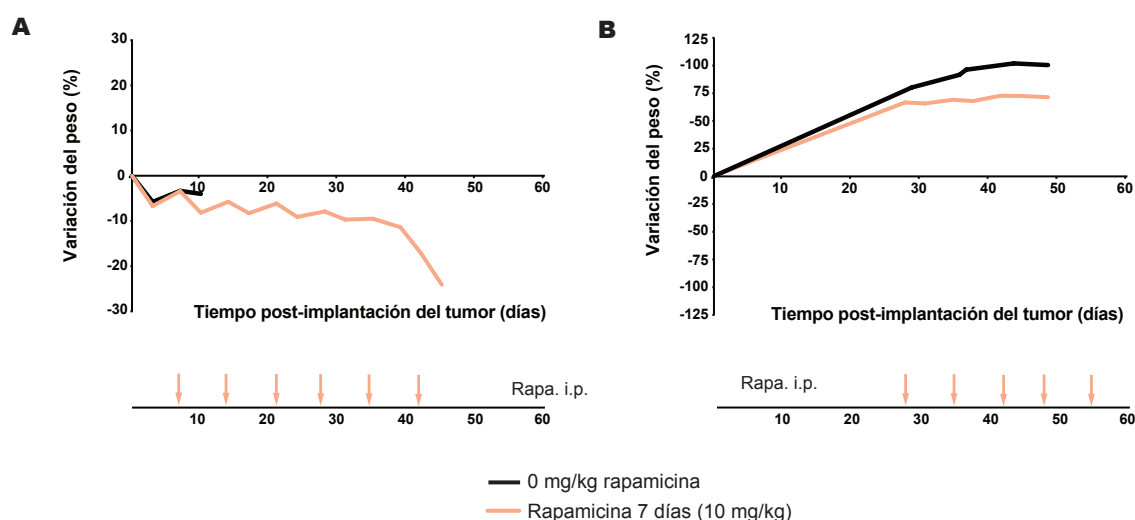


Fig. 4.25 Evolución del peso de los animales xenotransplantados con células U87MG o CSCs-5. Los animales fueron tratados con 10 mg/kg de rapamicina cada 7 días, comenzando los días 7 y 28 tras el implante de las células (A) U87MG y (B) CSCs-5, respectivamente.

Los animales con tumores CSCs-5, ganaron peso en los primeros 28 días después de la implantación del tumor. Una vez comenzó el tratamiento, perdieron peso después de cada inyección intraperitoneal de rapamicina, pero fueron capaces de recuperar parcialmente del peso perdido entre cada inyección.

Resultados

4.3.8. Supervivencia de animales xenotransplantados ortotópicamente con CSCs-5 o U87MG tratados con rapamicina intraperitonealmente

Los estudios de supervivencia se realizaron mediante modelos de animales xenotransplantados de glioblastoma intracraneal usando U87MG y CSCs-5 (Fig. 4.26).

Diez ratas inmunodeficientes recibieron un implante de células tumorales U87MG en el estriado y fueron divididas aleatoriamente en dos grupos. Siete días tras el implante del tumor comenzó el tratamiento con una dosis intraperitoneal de rapamicina. En torno a los días 12-16, todas las ratas control desarrollaron síntomas neurológicos indicativos de la presencia de tumores intracraneales grandes, posteriormente confirmados por los estudios histológicos (MS= 14 días). Los animales tratados con rapamicina con 10 mg/kg una vez por semana mostraron un incremento de la supervivencia, fallecieron entre los 40 y 47 días (MS= 45,2 días, $P= 0,000321$) (Fig. 4.26.A).

Doce ratas atímicas recibieron un implante de células tumorales CSCs-5 en el estriado, y posteriormente fueron divididas de forma aleatoria en dos grupos: grupo control y tratado. Veintiocho días después de la implantación del tumor las ratas comenzaron a recibir el tratamiento con inyecciones intraperitoneales de rapamicina. En torno a 57-66 días tras el implante, todas las ratas control comenzaron a desarrollar síntomas neurológicos causados por tumores intracraneales de gran tamaño (MS= 61,6 días). Los animales tratados con 10 mg/kg de rapamicina una vez por semana no mostraron un aumento significativo de la supervivencia, todos los animales fallecieron a los 60-68 días (MS= 63,83 días, $P= 0,431$), (Fig. 4.26.B).

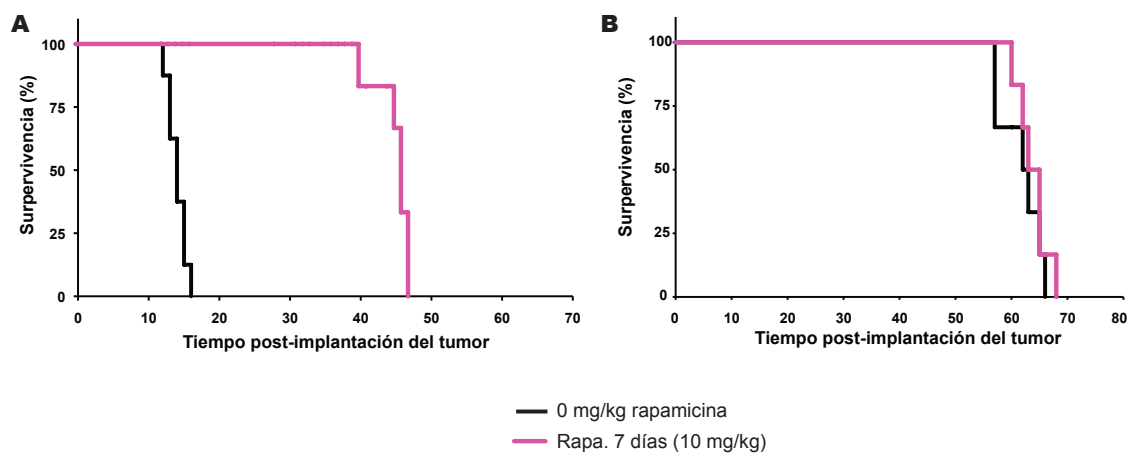


Fig. 4.26 Estudio de supervivencia de animales xenotransplantados con células (A) U87MG o (B) CSCs5 tratados con administraciones intraperitoneales de rapamicina, 10 mg/kg, cada 7 días, comenzando los días 7 y 28 tras el implante de las células (A) U87MG y (B) CSCs-5 respectivamente.

4.4. Análisis del efecto de la terapia combinada de rapamicina y nanoliposomas cargados con CPT-11 in vitro y en modelos de xenotransplantes de GBM en roedores

Con los tratamientos basados en rapamicina diseñados hasta el momento, si bien se consiguió un claro beneficio terapéutico, no se logró erradicar completamente el tumor. Conscientes de la importancia de las terapias combinadas en GBM, quisimos analizar el efecto terapéutico de la combinación de un fármaco citotóxico, el CPT-11, con el efecto citostático de la rapamicina.

4.4.1. Efectos citostático y citotóxico de rapamicina y nLs-CPT-11

Para confirmar que la capacidad citotóxica del CPT-11 no se pierde al ser encapsulado en nanoliposomas (nLs-CPT-11) se realizó un experimento in vitro utilizando diferentes concentraciones del mismo frente a dos líneas de GBM: U87MG y U251MG. Simultáneamente se analizó el efecto citostático de 9 concentraciones de rapamicina en las mismas líneas celulares. El efecto de las diferentes concentraciones de rapamicina y nLs-CPT-11 fue analizado en tres tiempos diferentes (24, 48 y 72 horas) (Fig. 4.27).

El crecimiento relativo de las células U87MG y en U251MG, después de añadir rapamicina, a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, se muestra en las figuras 4.27.A y 4.27.B. Los resultados entre las diferentes concentraciones y tiempos resultaron casi idénticos, sugiriendo que no hay diferencias discernibles en el potencial citostático entre las distintas concentraciones en ambas líneas celulares.

El solvente de la rapamicina no parece causar ninguna citotoxicidad a las células U87MG y U251MG en las concentraciones empleadas.

La rapamicina no genera efectos citotóxicos en ninguna de las dos líneas celulares, pero sí tiene un efecto citostático. Cuando se añadieron 2,5 ó 1000 ng/ml de rapamicina a las células U87MG, el crecimiento celular a las 24 horas se redujo al 90,4% y 92,4%, respectivamente, mostrando una diferencia significativa respecto al control ($p < 0,001$). A las 48 horas el crecimiento celular se redujo, a valores entre 72,1% y 77,7%, respectivamente, mostrando una diferencia significativa respecto al control ($p < 0,001$). A las 72 horas, el crecimiento celular no varió mucho con respecto a las 48 horas, dando unos resultados de entre 65,7% y 74,7%, respectivamente ($p < 0,001$ respecto al control) (Fig. 4.27.A).

Los resultados fueron diferentes cuando se administró rapamicina a las células U251MG. Las células U251MG tratadas durante 24 horas no tuvieron diferencias significativas en el crecimiento con respecto a las células control. A las 48 horas del tratamiento, el fármaco comenzó a afectar ligeramente al crecimiento celular reduciéndolo al 90,0% y 96,0% respecto al control ($p < 0,05$). Después de 72 horas de tratamiento, el crecimiento celular se redujo a valores entre 84,7% y 91,9% ($p < 0,001$) (Fig. 4.27.B).

Aunque la inhibición del crecimiento celular fue observada en ambas líneas celulares, el efecto citostático fue menor para U251MG que para U87MG.

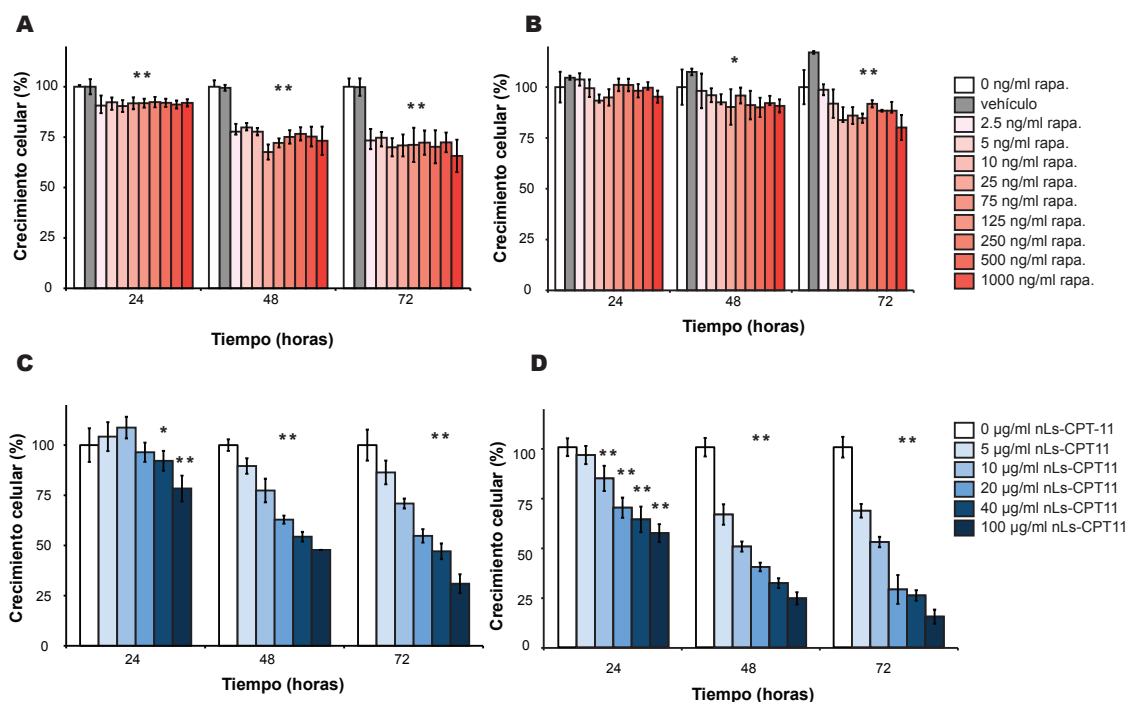


Fig. 4.27 Número relativo de células al cabo de distintos tiempos de incubación y concentraciones de rapamicina en (A) U87MG y (B) U251MG y de nLs-CPT-11 en (C) U87MG y (D) U251MG. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$.

Resultados

El mismo experimento fue realizado con nLs-CPT-11. La proporción de células U87MG y U251MG viables después de añadir nLs-CPT-11 durante 24, 48 y 72 horas se reflejan en las [figuras 4.27.C y 4.27.D](#).

Las gráficas para las diferentes concentraciones de nLs-CPT-11 sugieren diferencias en el potencial citotóxico entre las distintas concentraciones: al incrementar la concentración de nLs-CPT-11, el efecto citotóxico también aumenta. A diferencia del tratamiento con rapamicina, la administración de nLs-CPT-11 sí genera un efecto citotóxico en U87MG y U251MG, ya que los valores de RLUs absolutos en las células tratadas son menores que los generados por el control a 24 horas, pudiendo discriminar de esta forma los procesos de muerte celular de la inhibición del crecimiento.

Cuando se añadió nLs-CPT-11 a las células U87MG ([Fig. 4.27.C](#)), la proporción de células viables a las 24 horas se redujo significativamente para las dosis más altas, 100 $\mu\text{g/ml}$ y 40 $\mu\text{g/ml}$, a 78,4% ($p < 0,001$) y 92,16% ($p < 0,005$) respectivamente. A las 48 horas el número de células viables se redujo significativamente para todas las concentraciones de nLs-CPT-11 utilizadas ($p < 0,001$). El efecto fue dependiente de la concentración de nLs-CPT-11, obteniéndose valores entre 47,8% para la dosis más alta (100 $\mu\text{g/ml}$) y 89,6% para la dosis más baja (5 $\mu\text{g/ml}$). En el último tiempo estudiado, 72 horas, la viabilidad celular continúa disminuyendo con respecto a 48 horas y el efecto sigue siendo dependiente de las concentraciones. Los resultados, para 100 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$, fueron de 30% y 86,4% respectivamente ($p < 0,001$ con respecto al control).

Los resultados obtenidos en la línea U251MG con nLs-CPT-11 siguieron el mismo patrón ([Fig. 4.27.D](#)). En estas células, la disminución de la viabilidad celular fue

significativa ($p < 0,001$) para todas las concentraciones utilizadas, excepto para la más baja, 5 $\mu\text{g/ml}$, en los experimentos a 24 horas. Los valores variaron entre 57,0% y 96,0% para 100 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. A las 48 horas del tratamiento, el fármaco afectó significativamente ($p < 0,001$) a la viabilidad celular, reduciéndola a valores de 24,4% (100 $\mu\text{g/ml}$) y 68,2% (5 $\mu\text{g/ml}$) respecto del control. A las 72 horas de tratamiento la viabilidad celular continuó disminuyendo, de manera más acusada para las dosis más altas que para las más bajas: 15,3% para 100 $\mu\text{g/ml}$ y 66,3% para 5 $\mu\text{g/ml}$.

En ambas líneas celulares se observó un fuerte disminución de la viabilidad celular aunque el efecto citotóxico fue mayor para U251MG que para U87MG.

4.4.2. Estudio del sinergismo de la combinación de rapamicina y nLs-CPT-11 in vitro (U87MG y U251MG)

Una vez analizados los efectos citostático y citotóxico de los fármacos por separado, llevamos a cabo un experimento para analizar la posible sinergia al combinar los dos agentes en el tratamiento de GBM. Realizamos el ensayo en las líneas celulares U87MG y U251MG.

El análisis de la posible sinergia se realizó mediante isobologramas (Berenbaum, 1981). Se trata de un análisis basado en el efecto de la combinación de compuestos a distintas concentraciones del que se puede deducir matemáticamente si se produce un efecto sinérgico. En cada uno de los ejes se representa la dosis equiefectiva de uno de los fármacos que se estudian respectivamente. Estos dos puntos se unen mediante una línea (isobolo) que también se conoce como línea de aditividad o de no interacción. A continuación se representa el valor de dosis de la combinación de ambos. Cuando la combinación es más efectiva que la suma de cada fármaco por separado, la ecuación define una línea cóncava por debajo del isobolo (sinergia). Cuando los agentes en combinación son menos efectivos que lo esperado la ecuación describe una línea convexa por encima del isobolo.

No se observó, en la combinación de rapamicina y nLs-CPT-11, sinergia ni en las células U87MG (Fig. 4.28.A) ni en las U251MG (Fig. 4.28.B).

4.4.3. Efecto del tratamiento combinado en la distribución del ciclo celular

Como ya hemos descrito con anterioridad, la rapamicina es un fármaco que produce un arresto en la fase G1 del ciclo celular. Por otra parte, el CPT-11 provoca un bloqueo en la fase G2 de las células. Realizamos, por tanto, un estudio del ciclo celular, en células U87MG tras la administración de los fármacos por separado y en combinación, para analizar el efecto generado.

Cuarenta y ocho horas después del tratamiento de células U87MG con el vehículo (control), 2,5 ng/ml de rapamicina, 1000 ng/ml de rapamicina, 10 $\mu\text{g/ml}$ nLs-CPT-11, o ambos agentes terapéuticos combinados (2,5 ng/ml de rapamicina + 10 $\mu\text{g/ml}$ de nLs-CPT-11 ó 1000 ng/ml de rapamicina + 10 $\mu\text{g/ml}$ de nLs-CPT-11), se analizó el efecto

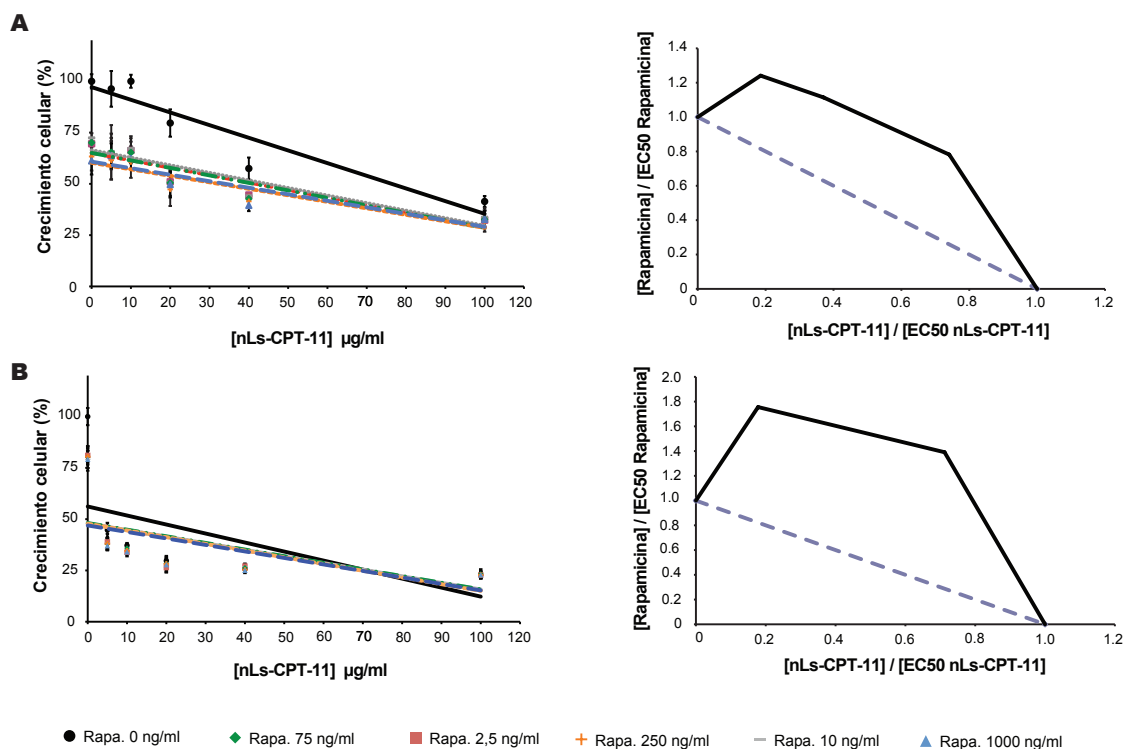


Fig. 4.28 Estudio del posible efecto sinérgico entre la rapamicina y nLs-CPT-11 mediante isoblograma. (A) Las células U87MG fueron tratadas simultáneamente durante 48 horas con cantidades crecientes de nLs-CPT-11 (0-100 $\mu\text{g/ml}$) y de rapamicina (0-1000 ng/ml). El análisis del isoblograma obtenido con los datos anteriores indicó que no existe sinergia entre los dos agentes (puntos sobre la línea azul). (B) El mismo estudio realizado en células U251MG tampoco indicó sinergia.

Resultados

en el ciclo celular. Las células U87MG expuestas sólo a nLs-CPT-11 presentaron un bloqueo significativo en G2 (18,5% para el control vs. 78,4% con nLs-CPT-11, $p < 0,05$), y un descenso significativo en G1 (desde 67,2% para el control a 20,4% con nLs-CPT-11, $p < 0,001$) (Fig. 4.29.B y 4.29.I).

Las células U87MG expuestas a rapamicina experimentaron una detención en G1, con el porcentaje de células en G1 creciendo desde 67,2% (control) hasta 75,1% (2,5 ng/ml rapamicina) y 78,5% (1000 ng/ml rapamicina, $p < 0,05$). También experimentaron una disminución significativa en G2, desde 18,5% (control) hasta 13,7% (2,5 ng/ml rapamicina, $p < 0,001$) y 11,5% (1000 ng/ml rapamicina, $p < 0,001$) (Fig. 4.29.C, 4.29.D, 4.29.G y 4.29.H).

El tratamiento combinado de rapamicina y nLs-CPT-11, originó un arresto de las células en G2 (18,5% para control vs. 42,9% para 2,5 ng/ml de rapamicina + 10 $\mu\text{g/ml}$ de nLs-CPT-11, ($p < 0,001$) ó 51,7% para 1000 ng/ml de rapamicina + 10 $\mu\text{g/ml}$ de nLs-CPT-11, ($p < 0,001$)) (Fig. 4.29.E, 4.29.F, 4.29.G y 4.29.H). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) en G2 al comparar los resultados obtenidos para rapamicina sola o en combinación con nLsCPT-11: 13,7% para 2,5 ng/ml rapamicina vs. 42,9% para 2,5 ng/ml de rapamicina + 10 $\mu\text{g/ml}$ de nLs-CPT-11 y 11,5% para 1000 ng/ml de rapamicina vs 51,7% para 1000 ng/ml de rapamicina + 10 $\mu\text{g/ml}$ de nLs-CPT-11) (Fig. 4.29.G y 4.29.H).

También se observó una disminución significativa en G1 para el tratamiento combinado: 67,2% para el control, 42,2% para 2,5 ng/ml de rapamicina + 10 µg/ml de nLs-CPT-11 ($p < 0,001$) y 34,2% para 1000 ng/ml de rapamicina + 10 µg/ml de nLs-CPT-11 ($p < 0,001$) (Fig. 4.29.E, 4.29.F, 4.29.G y 4.29.H). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) en G1 al comparar los resultados obtenidos para tratamientos con los fármacos solos o en combinación: 75,1% para 2,5 ng/ml rapamicina vs. 42,2% para 2,5 ng/ml de rapamicina + 10 µg/ml de nLs-CPT-11; 78,5% para 1000 ng/ml de rapamicina vs 34,3% para 1000 ng/ml de rapamicina + 10 µg/ml de nLs-CPT-11 y 20,4% para 10 µg/ml de nLs-CPT-11 vs. 42,2% para 2,5 ng/ml de rapamicina + 10 µg/ml de nLs-CPT-11 ó 34,3% para 1000 ng/ml de rapamicina + 10 µg/ml de nLs-CPT-11) (Fig. 4.29.G y 4.29.H).

Al realizar el análisis de la apoptosis producida por la adición de los fármacos, se obtuvo un incremento de la misma con los tratamientos que contenían nLs-CPT-11. Los valores de apoptosis obtenidos para cada fármaco y sus combinaciones fueron: control (14,2%); rapamicina 2,5 ng/ml (16,8%); rapamicina 1000 ng/ml (17,17%); nLs-CPT-11 10 µg/ml (29,9%); rapamicina 2,5 ng/ml + nLs-CPT-11 10 µg/ml (33,4%); rapamicina 1000 ng/ml + nLs-CPT-11 10 µg/ml (34,5%). Se observó una ligera tendencia al aumento de la apoptosis cuando se combinó rapamicina y nLs-CPT-11, pero no de forma significativa.

4.4.4. Detección de pS6 in vitro por inmunocitoquímica tras la administración de los fármacos individualmente o en combinación

Resultados

El efecto de la rapamicina en la vía de mTOR está medido por la inhibición de la fosforilación de la proteína ribosomal S6. Se quiso ver si el efecto se mantenía cuando, además de con rapamicina, las células eran tratadas con nLs-CPT-11.

Para ello, se sembraron células U87MG y se estudió la fosforilación de la proteína S6 después de 48 horas de incubación con 1000 ng/ml de rapamicina, 10 µg/ml de nLs-CPT-11 o una combinación de ambos fármacos (Fig. 4.30).

Ya habíamos observado que la proteína pS6 se expresaba en las células U87MG y que después del tratamiento con rapamicina se producía una inhibición total de la fosforilación de S6. Al administrar nLsCPT-11 a las células, no se modificó el nivel de fosforilación de S6 con respecto a las células control. En cambio, al combinar ambos compuestos, el efecto en la fosforilación de S6 fue exactamente el mismo que el obtenido con rapamicina como agente único. De esta forma se determinó que la combinación de los fármacos no interfiere en el efecto inhibitorio de la vía mTOR de la rapamicina

4.4.5. Optimización del patrón de administraciones para una terapia combinada de rapamicina con nLs-CPT-11

Se llevó a cabo un experimento en el que se probaron diferentes calendarios de administración de fármacos en células U87MG con el objetivo de establecer el calendario de tratamiento para la terapia combinada (rapamicina + nLs-CPT-11) que maximizase

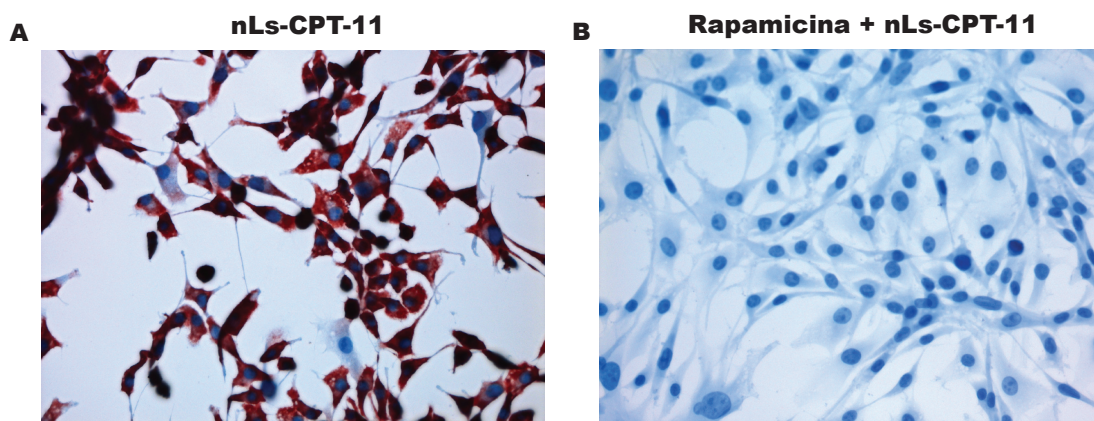


Fig. 4.30 Detección inmunocitoquímica de pS6 en células U87MG tratadas con: (A) 10 µg/ml de nLs-CPT-11. (B) con 1000 ng/ml de rapamicina y 10 µg/ml de nLs-CPT-11. (x 40).

el efecto terapéutico en modelos de tumores intracraneales inducidos por U87MG (Fig. 4.31).

Se analizaron tres calendarios diferentes para la administración de la combinación de rapamicina y nLs-CPT-11: (1) se administraron primero 1000 ng/ml de rapamicina y 24 horas después, 10 µg/ml de nLs-CPT-11; (2) se añadieron primero 10 µg/ml de nLs-CPT-11 y, 24 horas después, 1000 ng/ml de rapamicina; y (3) se administraron 10 µg/ml de nLs-CPT-11 y 1000 ng/ml de rapamicina simultáneamente.

A las 24 horas desde el inicio del tratamiento, no se encontró una diferencia significativa en la viabilidad celular entre las células tratadas y las no tratadas, pero a las 48 horas sí se encontraron variaciones significativas en la viabilidad celular. Comparando

Resultados

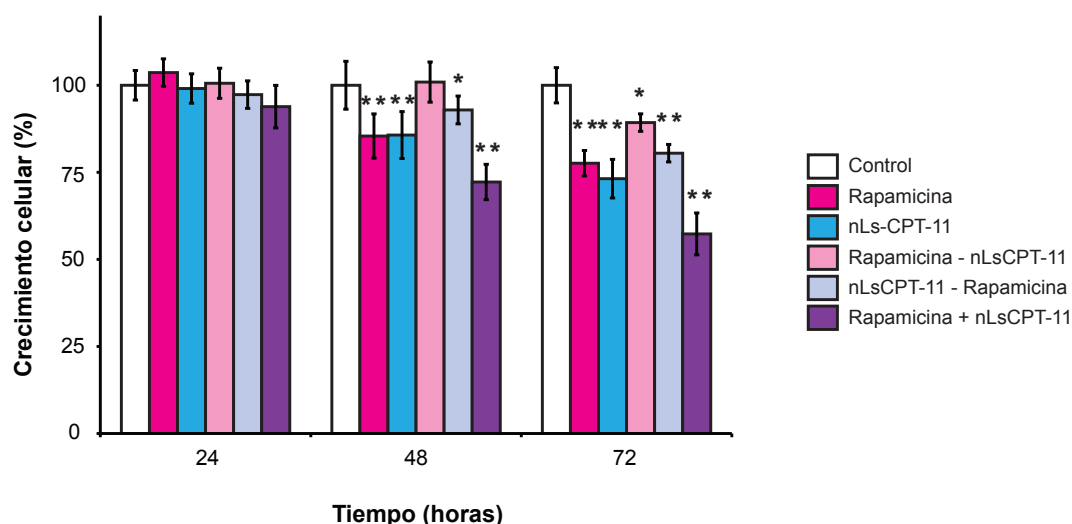


Fig. 4.31 Experimento in vitro para determinar el orden óptimo del tratamiento. Los fármacos fueron suministrados solos o en combinación. Para el tratamiento combinado se suministró: 1000 ng/ml de rapamicina y 24 horas después 10 µg/ml de nLs-CPT-11 (Rapamicina-nLs-CPT-11); o 10 µg/ml de nLs-CPT-11 y 24 horas después 1000 ng/ml de rapamicina (nLs-CPT-11-Rapamicina); o 1000 ng/ml rapamicina y 10 µg/ml de nLs-CPT-11 al mismo tiempo (Rapamicina+nLs-CPT-11).

los resultados de la combinación con los obtenidos por rapamicina y nLs-CPT-11 como agentes únicos, la única combinación que produce efecto es rapamicina + nLs-CPT-11 ($p < 0,001$ respecto a los agentes únicos).

A las 72 horas del comienzo del tratamiento con los fármacos, todas las condiciones manifestaron una variación significativa con respecto a las células control ($p < 0,001$), 100 % para el control vs. 77,6% para rapamicina, 73,2% para nLs-CPT-11, 89,3% para rapamicina-nLs-CPT-11, 80,5% para nLs-CPT-11-rapamicina y 57,3% para rapamicina + nLs-CPT-11. Como sucedió a las 48 horas, el único patrón capaz de producir mayor inhibición que los agentes de forma independiente fue la combinación rapamicina + nLs-CPT-11 ($p < 0,001$). De estos datos se deduce que el patrón de adición capaz de generar el mayor efecto celular in vitro fue la adición simultánea de rapamicina y nLs-CPT-11.

4.4.6. Análisis de la toxicidad sistémica del tratamiento in vivo con la combinación de rapamicina y nLs-CPT-11

Una vez determinado el orden de adición de fármacos óptimo para el tratamiento, procedimos a realizar dos ensayos de supervivencia utilizando ratas inmunodeficientes con tumores U87MG ortotópicos.

Resultados

Se utilizaron dos calendarios diferentes de administración de los fármacos para el estudio (Tabla 4.3). El primero consistió en la combinación de la administración mediante CED de nLs-CPT-11 el día 7 junto con inyecciones i.p. de rapamicina los días 7, 8, 9, 15, 16 y 17 (tratamiento de ciclo). El segundo se basó en la misma administración de CPT-11 con la administración i.p. de rapamicina cada 5 días, empezando 7 días después de la implantación de las células.

Los animales empleados para la determinación de la eficacia antitumoral de los tratamientos combinados fueron controlados para detectar posibles signos de toxicidad durante el tratamiento. Se observó pérdida de pelo en todos los animales tratados con rapamicina, aproximadamente 15 días después del primer día del tratamiento. Todos los animales fueron capaces de recuperar el pelo una vez finalizado el tratamiento.

Se registró también el peso de los animales (Fig. 4.32.A y 4.32.B). Todos los animales sufrieron una ligera pérdida de peso después de la implantación de las células, siendo menor que 2,2% de su peso original. Cuando los animales recibieron las inyecciones i.p. de rapamicina sufrieron una pérdida de peso de entre 0,56% y 7,64%. Los animales que recibieron rapamicina cada 5 días fueron capaces de recuperar peso antes de la siguiente inyección. Los animales que recibieron el tratamiento de ciclo recuperaron peso una vez acabado el tratamiento.

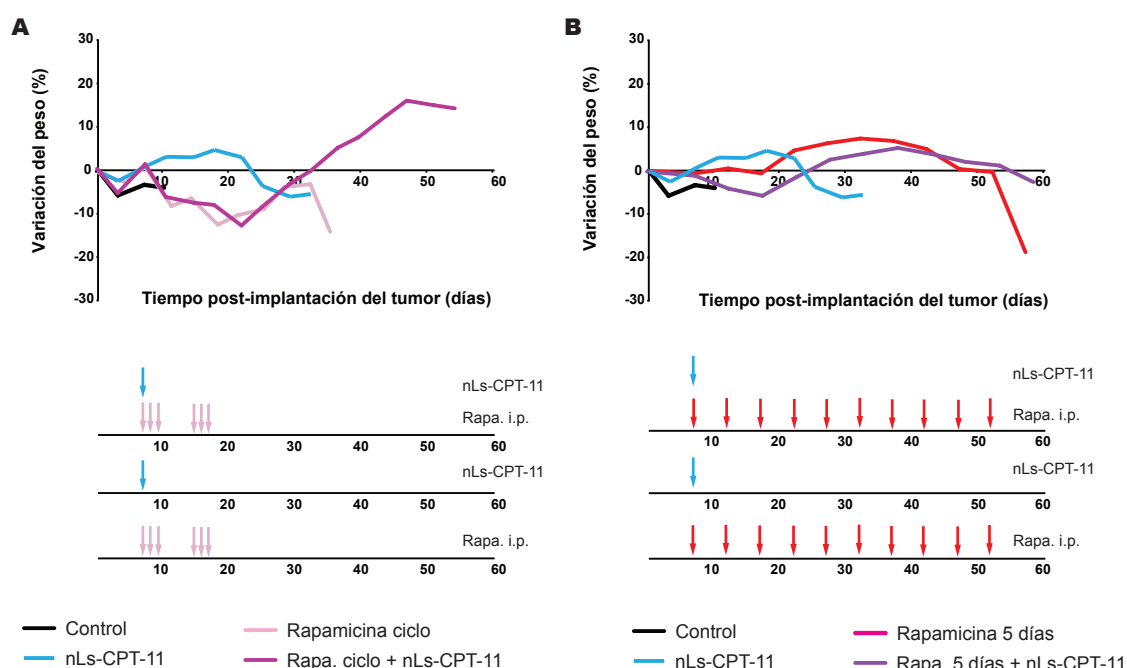
En contraste con los animales tratados con administración i.p. de rapamicina, no se observó pérdida de peso en ninguno de los animales tratados por CED de nLs-CPT-11 como agente único, sugiriendo que la intervención no afectó a los animales: ganaron alrededor de 4,7% de su peso en los días posteriores al CED.

El tratamiento combinado no supuso un aumento significativo en la pérdida

Tabla 4.3 Animales empleados

Fármaco	Dosis	Calendario tratamiento (días)	Tipo de administración	n	Estudio
Rapamicina	10 mg/kg	7,8,9,15,16,17	i.p.	6	Supervivencia
Rapamicina	10 mg/kg	Cada 5	i.p.	6	Supervivencia
nLs-CPT-11	0.8 mg	7	CED	6	Supervivencia
nLs-CPT-11	0.8 mg	7	CED	6	Supervivencia
Rapamicina	10 mg/kg	7,8,9,15,16,17	i.p.	6	Supervivencia
nLs-CPT-11	0.8 mg	7	CED	6	Supervivencia
Rapamicina	10 mg/kg	Cada 5	i.p.	6	Supervivencia
Rapamicina vehículo		Cada 5	i.p.	6	Supervivencia
PBS		7	CED	6	Supervivencia
Rapamicina vehículo		7,8,9,15,16,17	i.p.	6	Supervivencia
PBS		7	CED	6	Supervivencia

de peso con respecto al tratamiento únicamente con rapamicina. En el tratamiento combinado con ciclo de rapamicina, las ratas redujeron su peso progresivamente hasta el final del ciclo (Fig. 4.32.A). Para la combinación consistente en administración por CED de nLs-CPT-11 junto con dosis i.p. de rapamicina cada 5 días, las ratas perdieron peso hasta el día 17 y comenzaron a ganarlo a partir de entonces. (Fig. 4.32.B).



Resultados

4.4.7. Efecto terapéutico de la combinación de rapamicina y nLs-CPT-11 en modelos de tumor intracraneal U87MG

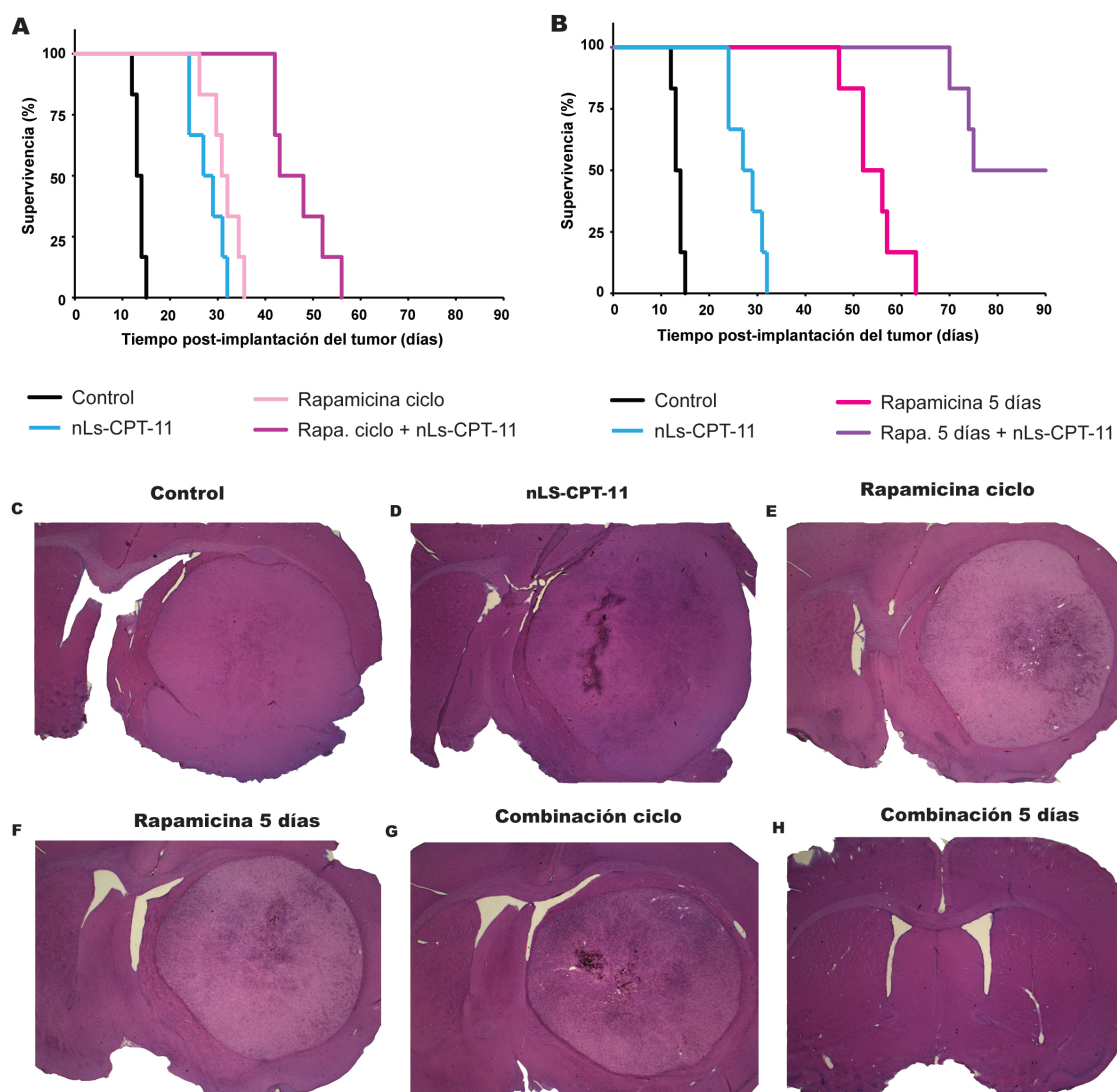
Se estudió la supervivencia en roedores con tumores intracraneales U87MG tratados con rapamicina y nLs-CPT-11 y la combinación de ambos (Tabla 4.3). El tratamiento comenzó 7 días después de la implantación de las células tumorales. Las ratas control fueron sacrificadas entre 12 y 15 días después de la implantación de las células tumorales, debido a síntomas neurológicos indicativos de la progresión del tumor (Fig. 4.33.A y 4.33.B). La MS para este grupo fue de 13,5 días.

Todos los animales que recibieron el tratamiento de 0,8 mg nLs-CPT-11 sobrevivieron 24–32 días, con una MS de 27,8 días ($P=0,000580$).

Todas las ratas que recibieron el tratamiento combinación de administración por CED de nLs-CPT-11 con ciclo de rapamicina, sobrevivieron hasta los 42-56 días (MS=47,2 días; $P<0,000580$). Estos datos sugieren un incremento en la supervivencia de los animales tratados con la combinación sobre el tratamiento con cada fármaco por separado (Fig. 4.33.A).

Todas las ratas de los grupos control, nLs-CPT-11, rapamicina en ciclo, rapamicina cada 5 días y combinación de rapamicina en ciclo con nLs-CPT-11 administrado por CED mostraron extensas masas tumorales cuando se realizó la evaluación histopatológica mediante tinción del tejido con hematoxilina y eosina, confirmando que el tumor fue la causa de la muerte de los animales (Fig. 4.33.C, 4.33.D, 4.33.E, 4.33.F y 4.33.G).

Tres de los seis animales que recibieron la terapia combinada de 0,8 mg nLs-CPT-11 y 10 mg/kg de rapamicina cada 5 días fueron sacrificados 70-75 días después de la implantación de las células tumorales, la tinción de los cerebros con hematoxilina y eosina certificó la existencia de tumores. Los otros tres animales sobrevivieron hasta la terminación del estudio, 90 días después de la implantación de las células tumorales. Dos de las ratas supervivientes no presentaban ninguna señal histológica de tumor (Fig. 4.33.H). Aunque en la histología *post mortem* de una de las ratas supervivientes se encontraron pequeñas formaciones tumorales, el animal no desarrolló ninguna señal neurológica de crecimiento de tumor intracraneal antes de la terminación del estudio. Se observó un incremento de seis veces en la supervivencia media de este grupo (MS=81,5 días), comparado con el control ($P=0,000580$). Se observó que la supervivencia del grupo combinación era superior a la suma de las supervivencias de cada fármaco por separado, sugiriendo un efecto sinérgico entre los compuestos in vivo, contrariamente al resultado obtenido in vitro (Fig. 4.33.B).



Resultados

Fig. 4.33 (A) Estudio de supervivencia de animales xenotransplantados con células U87MG tratados con ciclo de rapamicina (10 mg/kg), nLs-CPT-11 (0,8 mg) o la combinación de ambos. (B) Estudio de supervivencia de animales xenotransplantados con tumores U87MG tratados con rapamicina (10 mg/kg) cada 5 días, nLs-CPT-11 (0,8 mg) o la combinación de ambos. (C-H) Análisis histológicos de cerebros representativos de los estudios de supervivencia, (tinción hematoxilina y eosina), realizados eln el momento del sacrificio del animal.

Discusión

Los ensayos clínicos realizados en pacientes con gliomas de alto grado para evaluar la eficacia de la rapamicina y sus análogos, no han alcanzado la respuesta esperada de una mayor supervivencia (Chang et al. 2004; Chang et al. 2005; Galanis et al. 2005; Chang 2006). Aunque el principal objetivo de estos estudios no fue alcanzado, sí se observaron mejoras radiográficas en algunos casos (Chang 2006). Pese a que se ha observado que el torisel es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, alcanzando grandes concentraciones en el tejido cerebral (220 ng/g al cabo de 30 minutos de finalizada la administración), la eficacia terapéutica del mismo ha sido limitada (Kuhn et al. 2007).

Con el objetivo de mejorar los resultados alcanzados hasta el momento, en este estudio se intentó optimizar el tratamiento con rapamicina mediante el análisis de las diferencias en la supervivencia de los animales tratados con diferentes calendarios y modos de administración del fármaco. Además se analizó el efecto producido en líneas de CSCs. Por último se diseñó una nueva combinación de agentes terapéuticos: la rapamicina y el CPT-11, que produce un notable incremento en la supervivencia de animales xenotransplantados con células de GBM humano.

5.1. Efecto de la rapamicina a distintas dosis, in vitro

Para conseguir una mayor eficiencia del fármaco rapamicina en el tratamiento del GBM humano es necesario tener en consideración cuáles son los posibles factores que están afectando a su efectividad. Algunos autores han considerado la importancia de la selección de los pacientes con los que se llevará a cabo el estudio, poniéndose de manifiesto que los pacientes que presentaban una deficiencia de la función PTEN respondían mejor al tratamiento que aquellos en los que no se encontró (Cloughesy et al. 2008). Este hecho pone de manifiesto la importancia del análisis de las muestras tumorales para la decisión del tratamiento que será el más adecuado para cada paciente. Otro de los factores a tener en cuenta es que los análisis de cuantificación de rapamicina o su análogo torisel en el cerebro que se han venido realizando, no permiten determinar la eficacia terapéutica de los mismos (Chang et al. 2004). La intensidad en la inhibición de mTOR no está correlacionada con la concentración en sangre o intracraneal de la rapamicina y sus análogos, remarcando la necesidad de modificar los criterios de evaluación para cuantificar su eficacia farmacodinámica (Kreisl et al. 2009). Los análisis del tejido tumoral estudiando de forma directa la inhibición de mTOR aportan mayor información y pueden ser de gran utilidad para definir la importancia terapéutica (Kuhn et al. 2007; Cloughesy et al. 2008).

Aunque se ha documentado la actividad citotóxica de la rapamicina (1 ng/ml) sobre la línea celular de meduloblastoma DAOY (Georger et al. 2001), Los datos presentados en esta tesis demuestran que la rapamicina y su análogo torisel ejercen un efecto citostático sobre las líneas de GBM humano U87MG y U251MG in vitro, confirmando de esta manera los análisis presentados por el NCI (del inglés: *Developmental Therapeutic National Cancer Institute*) para diversos tipos de tumores (Fig. 4.1). Dicho efecto fue mas

notable en células U87MG que en U251MG, sugiriendo que las U251MG son menos dependientes de la vía de mTOR in vitro. El efecto citostático mostró ser independiente de la dosis ya que, al incrementar la concentración 400 veces (2,5 ng/ml y 1000 ng/ml), no se encontraron diferencias sustanciales tal y como ocurre en las líneas celulares de rhabdomyosarcoma y glioblastoma infantil en rangos de concentraciones que abarcan de 1 ng/ml a 10.000 ng/ml (Hosoi et al. 1998). Este comportamiento resulta interesante a la hora de trasladar el experimento a in vivo, debido a que, si el efecto se mantiene, se podría conseguir disminuir la toxicidad asociada al fármaco.

La diana de la rapamicina, la proteína mTOR, controla de forma directa varios factores post-mTOR, como 4E-BP1 y p70S6K (Ferrari and Thomas 1994). El estudio de dichos factores ha sido establecido como método de cuantificación de la actividad de la rapamicina y sus análogos (Heimberger et al. 2005). La quinasa p70S6K es una proteína muy atractiva como marcadora de inhibición, dado que es la primera proteína sobre la que actúa directamente mTOR. Pero debido a su alta similitud estructural con p90S6K, la cual no es fosforilada por mTOR, puede dar lugar a resultados confusos (El-Salem et al. 2007). Por ello, en este trabajo se evaluó el nivel de fosforilación de la proteína S6 en la Ser 235/236 como marcador de la inhibición de mTOR, debido a que los datos publicados por otros autores mostraban mayor correlación con este factor (Boulay et al. 2004). Una de las conclusiones más interesantes que aportaron los análisis de la proteína S6 obtenidos in vitro, es que la inhibición de la vía mTOR es independiente de la dosis de rapamicina para la línea celular U87MG; en cambio, la línea celular U251MG es dosis dependiente, al igual que sucede con la línea celular de GBM D54MG (Goudar et al. 2005) pese a que el efecto citostático resultó independiente de la dosis. Estas observaciones sugieren la menor sensibilidad a la rapamicina y el torisel de las células U251MG frente a las U87MG y la posibilidad de tratar algunos glioblastomas reduciendo la dosis sin perder eficacia.

Discusión

Un aspecto muy estudiado de las células tumorales es que la activación de las cascadas de señalización celular provocan alteraciones en la regulación de la maquinaria del ciclo celular (Malumbres and Barbacid 2001), favoreciendo una proliferación celular descontrolada causada por factores físicos, químicos, genéticos o biológicos. Los eventos que tienen lugar en el ciclo celular sugieren una asociación clara entre las anomalías del mismo y la progresión del glioblastoma (Collins et al. 1997). Las alteraciones en el ciclo celular representan una de las causas principales de gliomagenesis; debido a este motivo resultarán de gran interés en el tratamiento del GBM aquellos fármacos capaces de interferir en él. La rapamicina, empleada en esta tesis, es un fármaco con una marcada actividad sobre el ciclo celular, generando arresto en G1 (Heimberger et al. 2005). Esto es debido, entre otros motivos, a su efecto inhibitorio sobre la ciclina D1 y a la disminución de la fosforilación del inhibidor de traducción 4EBP1, lo cual provoca el aumento de los niveles de eIF4E e impide el inicio de la traducción de mRNAs requeridos para la transición de fase G1 a S (Faivre et al. 2006). Nuestros datos demuestran que este arresto en G1 también resultó ser independiente de la dosis empleada y no generó apoptosis con ninguna de las dos concentraciones analizadas (2,5 ng/ml y 1000 ng/ml)

en células U87MG, ratificando de esta manera el efecto no citotóxico, sino citostático, de la rapamicina.

Los análisis realizados in vitro con rapamicina en este trabajo han demostrado por tanto que un aumento en la concentración del fármaco de 400 veces no implica un incremento en la capacidad citostática para ambas líneas celulares, en la inhibición de la vía mTOR, ni en el arresto en fase G1 en las células U87MG. Si bien, otros autores describieron la dependencia de la concentración en la actividad del fármaco tanto en proliferación celular, como en inhibición de la fosforilación de 4EBP1 ó p70S6, hay que considerar que dichas diferencias se encontraron al utilizar concentraciones de rapamicina que estaban comprendidas entre 0,1 y 1 ng/ml, rango en el cual probablemente se encuentre el límite de concentración terapéutica ([Geoerger et al. 2001](#); [Peralba et al. 2003](#); [Heimberger et al. 2005](#)).

5.2. Mejoras en el tratamiento de GBM humano con rapamicina, in vivo

Aunque existe una gran cantidad de trabajos en los que se estudia, tanto en modelos animales como en pacientes, la cantidad de rapamicina o su análogo torisel en sangre o en el cerebro ([Punt et al. 2003](#); [Chang et al. 2004](#); [Raymond et al. 2004](#); [Boni et al. 2007](#); [Kuhn et al. 2007](#)), o la inhibición de la vía mTOR en el tumor ([Eshleman et al. 2002](#); [Goudar et al. 2005](#); [Heimberger et al. 2005](#); [Charest et al. 2006](#); [Cloughesy et al. 2008](#)), en pocos estudios se realiza un seguimiento a lo largo del tiempo del estado de inhibición de la vía. Debido a que este dato es de gran utilidad en el diseño del tratamiento, en este trabajo se realizó el estudio de la fosforilación de la proteína S6 in vivo, como indicador a lo largo del tiempo del estado de la vía mTOR. De esta manera, se ha conseguido una optimización en el tratamiento del GBM humano en animales xenotransplantados debida, entre otros motivos, a la modificación del calendario de tratamiento.

Previamente se habían ensayado diversas variantes en la administración de rapamicina y sus análogos para el tratamiento de GBM, como el tratamiento diario, el tratamiento de 5 días a la semana, o el tratamiento de 3 días a la semana ([Eshleman et al. 2002](#); [Goudar et al. 2005](#); [Heimberger et al. 2005](#)). Aunque en algunos de estos estudios se consiguió duplicar la supervivencia de los animales, en otros casos no se observó un incremento significativo, debido a que en el diseño del experimento se consideró la toxicidad para el animal, pero no se tuvo en cuenta la actividad del fármaco. En un estudio realizado por [Geoerger et al. \(2001\)](#), en meduloblastoma, ya se propone que la variación en el calendario de tratamiento modifica la eficacia del mismo. En esta tesis se ha demostrado que el correcto diseño del calendario de tratamiento, basado en el estado de inhibición de la vía mTOR, modifica la supervivencia de animales xenotransplantados con GBM humanos, lográndose extender la vida de los animales xenotransplantados en 3,23 (tratamiento cada 7 días) y 4 veces (tratamiento cada 5 días), sin generar efectos tóxicos. Proponemos, por tanto, que la mejora en la supervivencia se debió principalmente al mantenimiento en el tiempo de la inhibición de la vía mTOR, lo cual

produjo una inhibición del crecimiento tumoral (Fig. 5.1).

Por otro lado, estudios previos habían mostrado la eficacia de la rapamicina en tumores intracerebrales U251MG al ser administrada intraperitonealmente. Aunque en estos estudios se encontraron diferencias en las supervivencias al variar las dosis administradas, dichas variaciones no estaban directamente relacionadas con el aumento de la dosis. Se obtuvieron unos incrementos en la supervivencia de 67%, 47% y 78% para las dosis de 200, 400 y 800 mg/kg (Houchens et al. 1983). Sin embargo, en nuestros ensayos de supervivencia tanto con rapamicina como con torisel, en animales xenotransplantados con U87MG, variando en 2,5 veces la dosis (10 mg/kg y 25 mg/kg), e incluso administrándose simultáneamente de manera intraperitoneal e intracraneal, no encontramos diferencias significativas en los incrementos de las supervivencias. Los fármacos actuaron de manera independiente de la dosis, poniendo de manifiesto que una vez lograda la inhibición de la vía de mTOR, la aportación de más cantidad de fármaco no ayuda a mantener dicha inhibición en el tiempo.

Existen varios análogos de la rapamicina que están siendo empleados en el tratamiento de GBM humano, aunque los beneficios obtenidos con ellos resultan controvertidos para algunos autores. Por ejemplo, (Heimberger et al. 2005) han descrito que el análogo oral de rapamicina, RAD001, es 3 veces menos eficaz que la rapamicina y (Messina et al. 2007) han determinado que tras una inyección intraperitoneal de 8 mg/kg de rapamicina o torisel, la rapamicina alcanza valores 3 veces mayores que su análogo en el cerebro del ratón. Los resultados presentados en esta tesis señalan en la

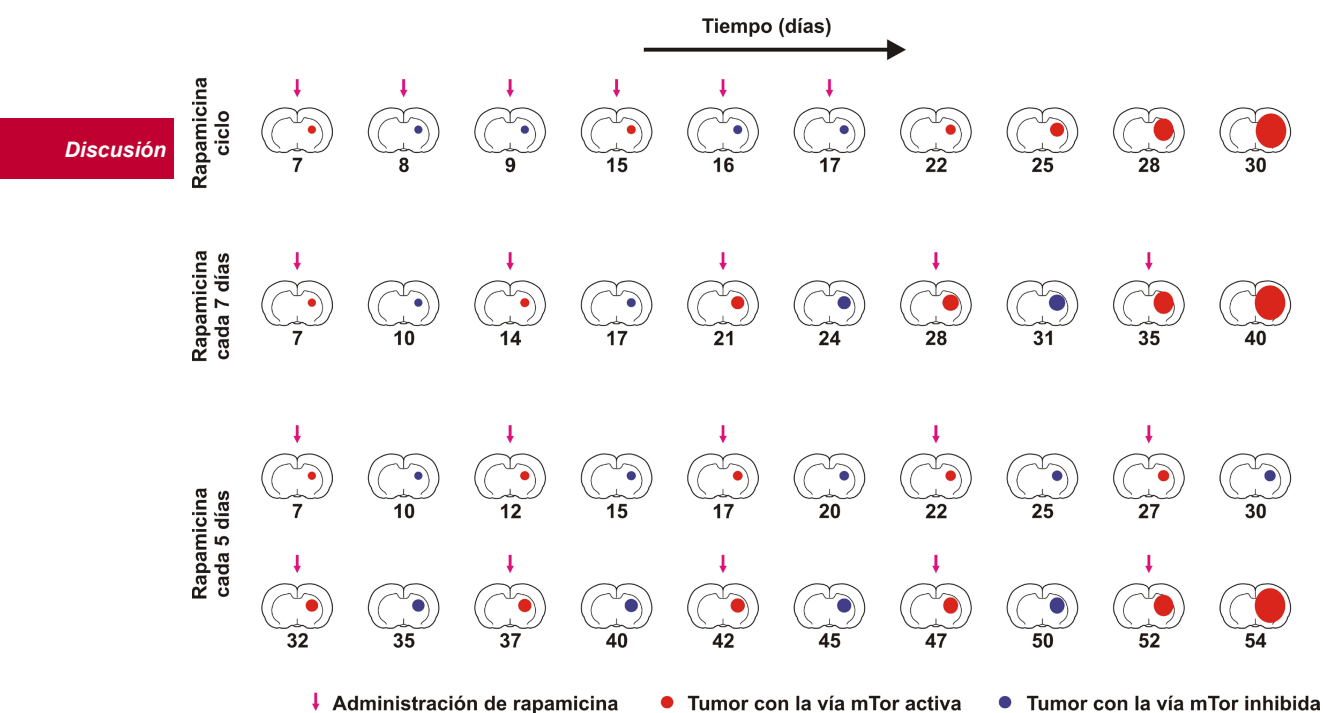


Fig. 5.1. Modelo propuesto de la evolución del crecimiento del tumor tras el tratamiento con rapamicina. El tumor se muestra en rojo cuando se encuentra con la vía de mTOR activa y en azul cuando está inhibida. Las flechas de color fucsia muestran los días en el que se administró rapamicina.

dirección opuesta a los anteriormente citados. Al comparar la efectividad terapéutica de rapamicina con la de su análogo torisel, no se observó ninguna diferencia significativa al administrar 10 ó 25 mg/kg. Aunque se encontraron ligeras diferencias en la inhibición de la vía de mTOR a lo largo del tiempo, no se apreciaron diferencias en la supervivencia. Este hecho apunta a que es posible que no sea necesaria una inhibición total de la vía de mTOR para impedir el desarrollo del tumor.

Nuestros resultados sugieren que cuando la rapamicina empieza a ser eliminada debido a la actividad del citocromo P450 y la estabilidad del complejo Rapamicina-FKBP se empieza a debilitar, una nueva administración del fármaco permite que la vía mTOR continúe inhibida. Además, un aumento de la concentración no implica una mejora terapéutica. Este punto es clave a la hora de intentar reducir la toxicidad derivada del tratamiento, puesto que se ha descrito la interrupción del tratamiento por el efecto tóxico del mismo (Chang et al. 2005). Mediante esta nueva perspectiva, se podría aumentar la duración del tratamiento disminuyendo la dosis, y al mismo tiempo incrementando el efecto terapéutico. En este punto cobra especial interés el análisis individualizado de las muestras de cada paciente, ya que sería de gran utilidad en el diseño de la dosificación y el plan de tratamiento más indicado en cada caso.

5.3. Reducción de la toxicidad sistémica y aumento de la efectividad del tratamiento de GBM humano con rapamicina por administración mediante CED

El sistema de administración potenciada por convención (CED) reduce la toxicidad producida por el agente administrado si se compara con la administración sistémica del mismo. Este sistema es capaz de aumentar la concentración del fármaco en el área a tratar, y evitar el paso del fármaco a través de la BBB (Bobo et al. 1994; Noble et al. 2006; Yamashita et al. 2007; Yang et al. 2010). Esta modalidad de administración ya ha sido utilizado para los agentes TRAIL (del inglés *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), o salirasib (ácido farmesil-tiosalicílico) entre otros (Saito et al. 2004; Goldberg et al. 2008). Aunque la técnica de CED ha demostrado ser una vía de administración óptima para algunos fármacos, en el presente trabajo no se obtuvo ningún beneficio terapéutico en animales xenotransplantados con células U87MG tras la administración mediante CED de rapamicina o torisel. Esto puede ser debido a dos factores importantes: bien porque la concentración máxima tolerada no tiene efecto terapéutico, o bien porque el fármaco es lavado rápidamente del tumor, no teniendo tiempo suficiente para actuar.

Una propuesta alternativa de mejora del sistema es la encapsulación del fármaco en nanoliposomas, lo cual permite aumentar su concentración. Al estar encapsulado produciría menor toxicidad tisular a la vez que se aumentaría la permanencia en el tumor, ya que la liberación del fármaco se realizaría de forma gradual. En trabajos realizados por (Noble et al. 2006), se consiguió aumentar más de 25 veces, la cantidad de CPT-11 administrada en el cerebro de los animales, sin aparente daño tisular. El efecto del

fármaco encapsulado en nanoliposomas, resultó en un incremento de 4 veces en la supervivencia de los animales.

5.4. Efecto de la rapamicina sobre CSCs derivadas de GBMs humanos

Existe una gran cantidad de líneas celulares de GBM humano utilizados en los laboratorios de experimentación como modelos para ensayos de eficacia terapéutica tanto in vitro como in vivo, como U87MG, U251MG, U373MG, D54MG, T98G, LN319, A172 o HU197 (Magrassi et al. 1998; Grouzmann et al. 2001; Tronstad et al. 2001; Lin et al. 2008; Widmer et al. 2008; Diaz Miqueli et al. 2009; Das et al. 2010; Fischer et al. 2010). Incluso, debido a la importancia que ha ido adquiriendo el estudio de las CSCs, se realizan ensayos con células troncales extraídas de estas líneas celulares comerciales (Yu et al. 2007). En esta tesis se ha comparado el efecto de la rapamicina en el crecimiento in vitro de las líneas celulares U87MG y U251MG frente a dos líneas de CSCs obtenidas de pacientes, CSCs-5 y CSCs-7 (Fig. 4.17), observándose marcadas diferencias. El bloqueo en el crecimiento aumenta del 25% para las líneas comerciales al 50% para las CSCs. Esta observación podría sugerir una mayor dependencia de la vía de mTOR de las CSCs in vitro frente a la observada en las líneas comerciales.

Uno de los principios básicos de la hipótesis de las CSCs es que dicha población es la responsable de originar y mantener el tumor (Reya et al. 2001). Por tanto, si las terapias empleadas contra GBM en la práctica clínica no consiguen erradicar las CSCs, el paciente probablemente sufrirá una recidiva del tumor (Schulenburg et al. 2006; Diehn et al. 2009; Zaidi et al. 2009). La adición de rapamicina a las CSCs-5 y CSCs-7 provocó una disminución del potencial tumorigénico de dichas líneas celulares, estimado in vitro mediante ensayos de formación de colonias en agar blando (Fig. 4.20 y 4.21). Estos resultados resultaron de gran interés puesto que la rapamicina in vitro fue capaz de reducir una de las características más importantes de las CSCs, como es su potencial tumorigénico.

Discusión

Aunque la utilización de la proteína transmembrana CD133 puede ser controvertida, ya que en ocasiones se ha observado que puede estar ausente en células con características de CSCs (Beier et al. 2007; Ogden et al. 2008), se analizó debido a que, en la actualidad, es uno de los marcadores más empleados para identificar la población CSCs (Singh et al. 2003; Singh et al. 2004). La adición de rapamicina a las líneas CSCs-5 y CSCs-7 provocó una pérdida de población CD133⁺, en más de un 30% (Fig. 4.18 y 4.19). Esta disminución pudo ser debida, entre otras causas, a la inducción de la diferenciación de las CSCs por parte de la rapamicina, o a procesos de muerte celular en dicha población. La segunda opción se descartó debido a los resultados obtenidos del análisis de muerte celular tras el tratamiento. Pese a haberse detectado un incremento en la cantidad de GFAP (del inglés *Glial Fibrillar Acid Protein*), marcador de glía ausente en CSCs (datos no mostrados), hacen falta experimentos adicionales, para confirmar la inducción de diferenciación.

Actualmente se conocen varias vías de señalización que pueden estar desempeñando un papel importante en el mantenimiento de las CSCs, entre las que se encuentra la vía PI3K/Akt/mTOR, clave también en el proceso de tumorigénesis (Hambardzumyan et al. 2008a; Hambardzumyan et al. 2008b; Bleau et al. 2009). Nuestros datos confirman la inhibición in vitro de la vía de mTOR en las líneas de CSCs, inducida por la rapamicina, debido a la observación de la disminución de los niveles de fosforilación de la proteína S6. Además, se detectó un aumento simultáneo de los niveles de fosforilación de Akt (Fig. 4.22). Aunque al ser Akt una proteína pre-mTOR no tendría por qué verse afectada por el efecto de la rapamicina, se ha descrito previamente que la inhibición de mTORC1 puede provocar hiperfosforilaciones de Akt en muchas líneas celulares, como vía de supervivencia alternativa (Houghton 2010).

La rapamicina fue capaz de inhibir significativamente la autorrenovación de las CSCs in vitro (Fig. 4.23). Este hecho resulta especialmente interesante si se tiene en cuenta que una de las características más importantes de las CSCs es su capacidad para autorrenovarse durante largos periodos de tiempo (Reya et al. 2001), y teóricamente podría impedir el mantenimiento de una reserva de CSCs que permitiese la prolongación de la existencia del tumor.

A pesar de que la rapamicina in vitro demostró ser capaz de influir en varias de las características más importantes de células troncales tumorales, el estudio de supervivencia realizado con animales xenotransplantados con células CSCs-5 y tratados con rapamicina, no mostró beneficio terapéutico (Fig. 4.26). No obstante, debemos tener en cuenta que el resultado obtenido con el modelo de CSCs es más próximo a lo que ocurre en los pacientes de los estudios clínicos que los resultados obtenidos con la línea celular comercial U87MG (Chang et al. 2004; Chang et al. 2005; Chang 2006). Este hecho sugiere que el modelo basado en CSCs es más representativo a la hora de ensayar nuevas terapias que el modelo de las células U87MG. Además, hay que tener en cuenta que la resistencia de las CSCs a determinadas terapias, como la radioterapia (Bao et al. 2006) y la quimioterapia con temozolomida (Clement et al. 2007), ya había sido descrita por otros autores. De esta manera, con los datos obtenidos podemos suponer que podría existir también una resistencia de las CSCs al tratamiento con rapamicina in vivo, lo cual podría ser una de las causas que explica la baja efectividad del fármaco en el tratamiento clínico de GBM humanos. También hay que considerar que es posible que el cultivo in vitro de CSCs no refleje las condiciones del nicho tumoral, puesto que las interacciones con el entrono pueden modificar su comportamiento debido a la plasticidad celular (Gupta et al. 2009). La dificultad de trasladar los estudios in vitro a in vivo pone de manifiesto la necesidad del uso de modelos animales para ensayar terapias experimentales, ante la incapacidad de imitar el contexto tumoral de los sistemas in vitro actuales.

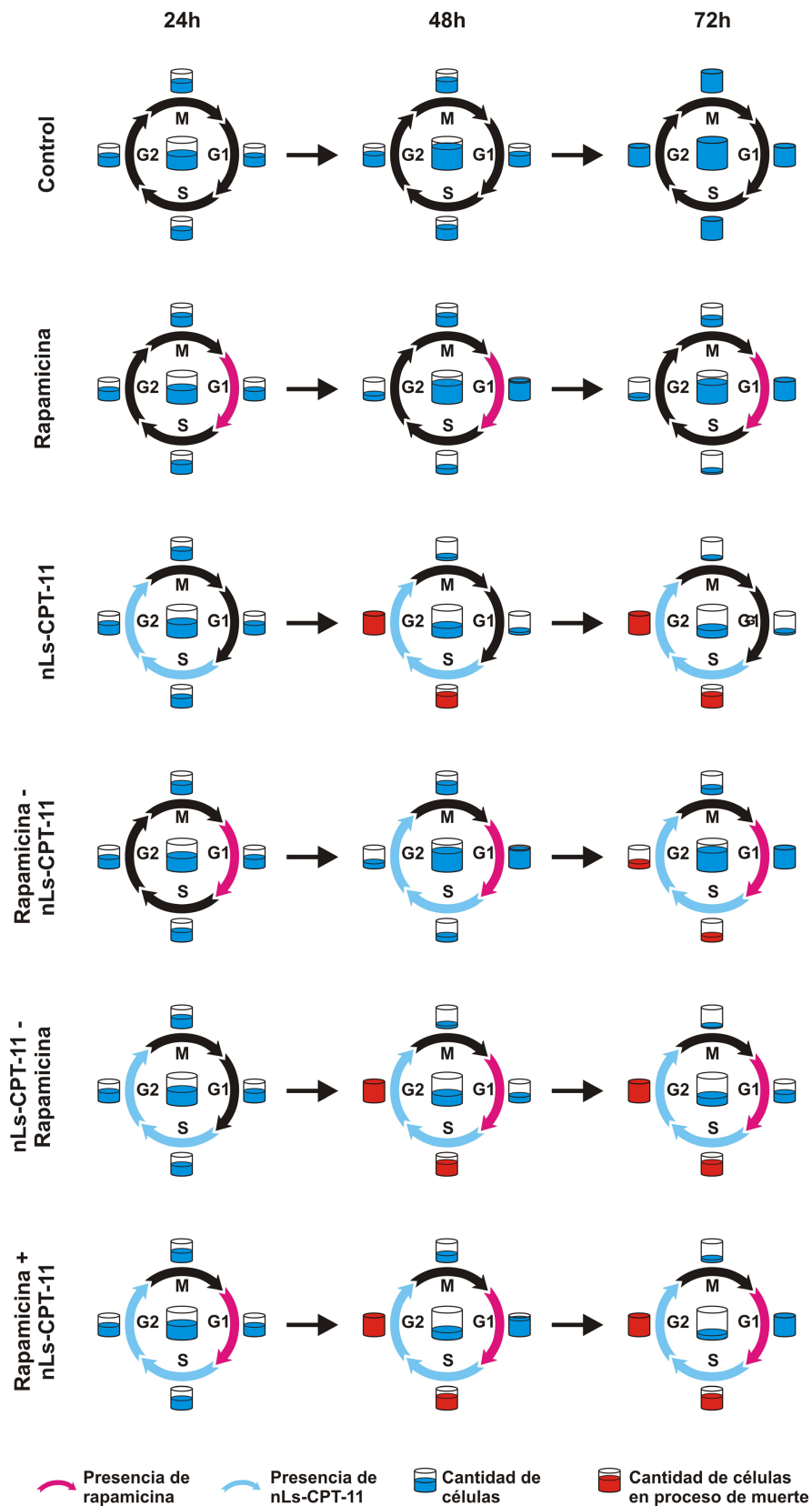
5.5. Aumento de la eficacia antitumoral de la combinación de rapamicina y CPT-11 frente a su uso individual

La capacidad citostática de la rapamicina en células de GBM humano impide el crecimiento tumoral, pero no parece conseguir la disminución del volumen en este tipo de tumores. Aunque se han obtenido buenos resultados en el tratamiento de otros tumores del SNC (Koenig et al. 2008; Lam et al. 2010), lográndose incluso una clara reducción del tumor, en el tratamiento de GBM humano los datos obtenidos en las pruebas clínicas no han sido muy esperanzadores (Chang et al. 2004; Chang et al. 2005; Galanis et al. 2005; Cloughesy et al. 2008).

En este trabajo se describe por primera vez la combinación de rapamicina con CPT-11 para el tratamiento del GBM humano, consiguiéndose beneficios terapéuticos mayores que los logrados por los fármacos en solitario. Dicha combinación presenta el atractivo de conjugar el efecto citostático de la rapamicina con el efecto citotóxico del CPT-11 (Fig. 4.27). Otros autores ya habían reconocido la importancia de la combinación de terapias en GBM, como la combinación de gefitinib y erlotinib, ensayado en pacientes con resultados dispares (Reardon et al. 2006; Kreisl et al. 2009; Reardon et al. 2010). La combinación de la inhibición de múltiples dianas en la misma vía o en distintas vías, aún presentando un gran potencial terapéutico, tiene el riesgo de aumentar los efectos tóxicos sistémicos producidos por la administración de los fármacos (Clarke et al. 2010). Una opción para sortear este problema es la combinación de fármacos utilizando distintos métodos de administración de los mismos (de Vries et al. 2006). Por este motivo, en el presente estudio se utilizó la combinación de los fármacos rapamicina y CPT-11 mediante administración intraperitoneal y CED, respectivamente.

Discusión

Ambos fármacos actúan de modo muy diferente sobre el ciclo celular. Mientras que la rapamicina genera arresto en la fase G1, el CPT-11 es dependiente de la fase S-G2 para su actividad, provocando un arresto en dichas fases que ha sido asociado con el fallo en la activación de la Cdc2, quinasa reguladora de la transición G2-M (Feun and Savaraj 2008). El compuesto induce la inhibición de la transcripción, replicación y reparación del DNA. Cuando se administran simultáneamente los fármacos se puede observar la combinación de efectos sobre el ciclo celular, siendo predominante el arresto en fase G2 provocado por el CPT-11, pero obteniendo valores inferiores a los obtenidos por el CPT-11 en solitario. La combinación de los fármacos provocó, además, un aumento en la apoptosis debido al efecto del CPT-11, al contrario de lo observado anteriormente en células de meduloblastoma para las cuales no se detectó un efecto citotóxico (Georger et al. 2001). Debido a que la actividad de los fármacos es dependiente del ciclo celular, el orden de administración de los mismos es de vital interés para la obtención de la máxima eficacia terapéutica. La administración simultánea de los fármacos en células sin sincronizar generó el mayor beneficio terapéutico, puesto que de esta manera se consigue que las células que en ese momento estén en fase S-G2 sean diana del CPT-11 y las que se encuentren en G1 detengan su crecimiento debido a la actividad de la rapamicina (Fig. 5.2).



Discusión

Fig. 5.2. Modelo propuesto sobre el efecto de la rapamicina y el CPT-11, de forma independiente o con los diferentes ordenes de administración combinada, sobre el ciclo celular. En el centro de cada ciclo se representa el total de células que se obtendrían en las condiciones expuestas.

El principal resultado obtenido en esta tesis supone un incremento de 6 veces en la supervivencia de animales xenotransplantados con tumores intracraneales U87MG al ser tratados con la combinación de rapamicina y CPT-11. Este hecho supone un gran avance en el contexto de los logros terapéuticos actuales en este tipo de tumores. Otros autores han conseguido aumentar en 4 veces la supervivencia de ratas con tumores U87MG al tratarlos con la combinación de retinoide sintético Am80 mediante CED con temozolomida mediante administración intraperitoneal ([Yokosawa et al. 2010](#)), sin animales que sobrevivan al tratamiento. O duplicar la supervivencia al realizar 2 administraciones de topotecan (TPT) mediante CED ([Grahm et al. 2009](#)). Para gliomas F98, al administrar carboplatino mediante CED y radioterapia, o temozolomida y radioterapia se ha conseguido incrementar la supervivencia en 2 veces o 7 días respectivamente.

Nuestros resultados sugieren la existencia de sinergia entre los dos fármacos cuando son empleados in vivo, al contrario de lo que se observó in vitro. Esta divergencia pone de manifiesto la influencia del entorno en el comportamiento celular, como ya ha sido demostrado mediante las diferencias en los perfiles globales de expresión génica cuando son analizados en contextos in vitro e in vivo ([Camphausen et al. 2005](#)).

Dentro del incremento global de la supervivencia, la variabilidad en los tiempos de supervivencia de los animales tratados con la combinación de rapamicina y CTP-11 puede ser debida a una distribución no homogénea de los liposomas administrados mediante CED. Puesto que no se ha monitorizado la administración del fármaco, no se pueden descartar fugas del compuesto a zonas sanas circundantes al tumor, como ya fue observado con anterioridad por ([Krauze et al. 2007](#)). Por tanto, el tratamiento podría ser optimizado monitorizando a tiempo real la instilación para visualizar el envío de los liposomas, confirmando de esta manera que el tumor está siendo cubierto por completo.

Conclusiones

- 1- El fármaco rapamicina mostró un efecto independiente de la dosis en su actividad citostática en células de GBM humano.
- 2- El análisis del estado de fosforilación de la proteína ribosomal S6 es un marcador eficaz para el análisis del estado de la inhibición de la vía mTOR a lo largo del tiempo.
- 3- El tratamiento, de forma intermitente y continuada realizado con rapamicina aumenta significativamente la supervivencia de los animales xenotransplantados con células de GBM humano U87MG. Sin embargo, el incremento de la dosis no produce un aumento en la supervivencia de los animales.
- 4- La administración potenciada por convención (CED) de rapamicina libre no proporciona un incremento en la supervivencia de animales xenotransplantados con células U87MG.
- 5- La rapamicina ejerce su efecto citostático in vitro sobre líneas de CSCs derivadas de GBMs humanos. Además, reduce la población CD133+.
- 6- Los tumores generados por las células troncales tumorales mostraron resistencia al tratamiento con rapamicina en modelos de ratas xenotranplantadas.
- 7- El CPT-11, agente citotóxico, y la rapamicina, agente citostático, no presentaron sinergia sobre líneas celulares de GBM humano al combinarse in vitro.
- 8- Se han observado diferentes efectividades según el orden de administración de la combinación de los agentes rapamicina y CPT-11. Esto es debido a que cada uno actúa en una fase diferente del ciclo celular, resultando ser la combinación óptima la adición simultánea de ambos fármacos.
- 9- La combinación de los fármacos rapamicina y CPT-11 produce un incremento de seis veces de la supervivencia de animales xenotransplantados con células de GBM humano U87MG. El tratamiento combinado no resultó tóxico debido a la combinación de métodos de administración: la rapamicina fue administrada mediante inyecciones intraperitoneales y el CPT-11 encapsulado en nanoliposomas (nLs-CPT-11) e instilado mediante administración potenciada por convención (CED).

Bibliografía

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., and Begley, D.J. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37(1): 13-25.
- Akhavan, D., Cloughesy, T.F., and Mischel, P.S. 2010. mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside. *Neuro-oncology*.
- ALZET. 2010. Pump Bibliography. In.
- Bankiewicz, K.S., Eberling, J.L., Kohutnicka, M., Jagust, W., Pivrotto, P., Bringas, J., Cunningham, J., Budinger, T.F., and Harvey-White, J. 2000. Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp Neurol* 164(1): 2-14.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444(7120): 756-760.
- Batchelor, T.T., Gilbert, M.R., Supko, J.G., Carson, K.A., Nabors, L.B., Grossman, S.A., Lesser, G.J., Mikkelsen, T., and Phuphanich, S. 2004. Phase 2 study of weekly irinotecan in adults with recurrent malignant glioma: final report of NABTT 97-11. *Neuro-oncology* 6(1): 21-27.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., and Beier, C.P. 2007. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer research* 67(9): 4010-4015.
- Bidros, D.S. and Vogelbaum, M.A. 2009. Novel drug delivery strategies in neuro-oncology. *Neurotherapeutics* 6(3): 539-546.
- Bleau, A.M., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E.I., Huse, J.T., Brennan, C.W., and Holland, E.C. 2009. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell* 4(3): 226-235.
- Bobo, R.H., Laske, D.W., Akbasak, A., Morrison, P.F., Dedrick, R.L., and Oldfield, E.H. 1994. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(6): 2076-2080.
- Boni, J., Leister, C., Burns, J., Cincotta, M., Hug, B., and Moore, L. 2007. Pharmacokinetic profile of temsirolimus with concomitant administration of cytochrome p450-inducing medications. *J Clin Pharmacol* 47(11): 1430-1439.
- Bouchard, J. 1958. Radiation therapy of malignant intracranial neoplasms. *Prog Radiat Ther* 1: 192-223.
- Boulay, A., Zumstein-Mecker, S., Stephan, C., Beuvink, I., Zilbermann, F., Haller, R., Tobler, S., Heusser, C., O'Reilly, T., Stolz, B., Marti, A., Thomas, G., and Lane, H.A. 2004. Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer research* 64(1): 252-261.
- Brada, M., Hoang-Xuan, K., Rampling, R., Dietrich, P.Y., Dirix, L.Y., Macdonald, D., Heimans, J.J., Zonnenberg, B.A., Bravo-Marques, J.M., Henriksson, R., Stupp, R., Yue, N., Bruner, J., Dugan, M., Rao, S., and Zaknoen, S. 2001. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Ann Oncol* 12(2): 259-266.
- Brennan, C., Momota, H., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Tandon, A., Pedraza, A., and Holland, E. 2009. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One* 4(11): e7752.
- Camphausen, K., Purow, B., Sproull, M., Scott, T., Ozawa, T., Deen, D.F., and Tofilon, P.J. 2005. Influence of in vivo growth on human glioma cell line gene expression: convergent profiles under orthotopic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(23): 8287-8292.
- CBTRUS. 2010. CBTRUS (2010). CBTRUS Statistical report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2006. Available at <http://www.cbtrus.org/2010-NPCR-SEER/CBTRUS-WEBREPORT-Final-3-2-10.pdf> (May 2010). Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale, IL www.cbtrus.org.

- CGARN 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455(7216): 1061-1068.
- Chan, J.L., Lee, S.W., Fraass, B.A., Normolle, D.P., Greenberg, H.S., Junck, L.R., Gebarski, S.S., and Sandler, H.M. 2002. Survival and failure patterns of high-grade gliomas after three-dimensional conformal radiotherapy. *J Clin Oncol* 20(6): 1635-1642.
- Chan, M.F., Schupak, K., Burman, C., Chui, C.S., and Ling, C.C. 2003. Comparison of intensity-modulated radiotherapy with three-dimensional conformal radiation therapy planning for glioblastoma multiforme. *Med Dosim* 28(4): 261-265.
- Chang, S.M. 2006. Does temsirolimus have a role in recurrent glioblastoma multiforme? *Nature clinical practice* 3(2): 70-71.
- Chang, S.M., Kuhn, J., Wen, P., Greenberg, H., Schiff, D., Conrad, C., Fink, K., Robins, H.I., Cloughesy, T., De Angelis, L., Razier, J., Hess, K., Dancey, J., and Prados, M.D. 2004. Phase I/pharmacokinetic study of CCI-779 in patients with recurrent malignant glioma on enzyme-inducing antiepileptic drugs. *Investigational new drugs* 22(4): 427-435.
- Chang, S.M., Wen, P., Cloughesy, T., Greenberg, H., Schiff, D., Conrad, C., Fink, K., Robins, H.I., De Angelis, L., Raizer, J., Hess, K., Aldape, K., Lamborn, K.R., Kuhn, J., Dancey, J., and Prados, M.D. 2005. Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Investigational new drugs* 23(4): 357-361..
- Charest, A., Wilker, E.W., McLaughlin, M.E., Lane, K., Gowda, R., Coven, S., McMahon, K., Kovach, S., Feng, Y., Yaffe, M.B., Jacks, T., and Housman, D. 2006. ROS fusion tyrosine kinase activates a SH2 domain-containing phosphatase-2/phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling axis to form glioblastoma in mice. *Cancer research* 66(15): 7473-7481.
- Chen, T.C., Su, S., Fry, D., and Liebes, L. 2003. Combination therapy with irinotecan and protein kinase C inhibitors in malignant glioma. *Cancer* 97(9 Suppl): 2363-2373.
- Cheshier, S.H., Kalani, M.Y., Lim, M., Ailles, L., Huhn, S.L., and Weissman, I.L. 2009. A neurosurgeon's guide to stem cells, cancer stem cells, and brain tumor stem cells. *Neurosurgery* 65(2): 237-249; discussion 249-250; quiz N236.
- Clarke, J., Butowski, N., and Chang, S. 2010. Recent advances in therapy for glioblastoma. *Arch Neurol* 67(3): 279-283.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. 2006. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research* 66(19): 9339-9344.
- Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I., and Ruiz i Altaba, A. 2007. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol* 17(2): 165-172.
- Cloughesy, T.F., Filka, E., Nelson, G., Kabbavar, F., Friedman, H., Miller, L.L., and Elfring, G.L. 2002. Irinotecan treatment for recurrent malignant glioma using an every-3-week regimen. *Am J Clin Oncol* 25(2): 204-208.
- Cloughesy, T.F., Yoshimoto, K., Nghiemphu, P., Brown, K., Dang, J., Zhu, S., Hsueh, T., Chen, Y., Wang, W., Youngkin, D., Liao, L., Martin, N., Becker, D., Bergsneider, M., Lai, A., Green, R., Oglesby, T., Koletto, M., Trent, J., Horvath, S., Mischel, P.S., Mellinghoff, I.K., and Sawyers, C.L. 2008. Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS medicine* 5(1): e8.
- Collins, K., Jacks, T., and Pavletich, N.P. 1997. The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7): 2776-2778.
- Cooper, J.D., Heppert, K.E., Davies, M.I., and Lunte, S.M. 2007. Evaluation of an osmotic pump for microdialysis sampling in an awake and untethered rat. *J Neurosci Methods* 160(2): 269-275.
- Das, A., Banik, N.L., and Ray, S.K. 2010. Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but not in human normal astrocytes. *Cancer* 116(1): 164-176.

- de Vries, N.A., Beijnen, J.H., Boogerd, W., and van Tellingen, O. 2006. Blood-brain barrier and chemotherapeutic treatment of brain tumors. *Expert Rev Neurother* 6(8): 1199-1209.
- Diaz Miqueli, A., Rolff, J., Lemm, M., Fichtner, I., Perez, R., and Montero, E. 2009. Radiosensitisation of U87MG brain tumours by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Br J Cancer* 100(6): 950-958.
- Dickinson, P.J., Lecouteur, R.A., Higgins, R.J., Bringas, J.R., Roberts, B., Larson, R.F., Yamashita, Y., Krauze, M., Noble, C.O., Drummond, D., Kirpotin, D.B., Park, J.W., Berger, M.S., and Bankiewicz, K.S. 2008. Canine model of convection-enhanced delivery of liposomes containing CPT-11 monitored with real-time magnetic resonance imaging. *J Neurosurg* 108(5): 989-998.
- Diehn, M., Cho, R.W., and Clarke, M.F. 2009. Therapeutic implications of the cancer stem cell hypothesis. *Semin Radiat Oncol* 19(2): 78-86.
- Dowling, R.J., Topisirovic, I., Fonseca, B.D., and Sonenberg, N. 2010. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1804(3): 433-439.
- Drummond, D.C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D.B., and Papahadjopoulos, D. 1999. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological reviews* 51(4): 691-743.
- Ehrlich, P. 1885. *Das Sauerstoff-Bedurfis des Organismus: Eine Farbenanalytische Studie*.
- El-Salem, M., Raghunath, P.N., Marzec, M., Wlodarski, P., Tsai, D., Hsi, E., and Wasik, M.A. 2007. Constitutive activation of mTOR signaling pathway in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 87(1): 29-39.
- Eng, C.P., Sehgal, S.N., and Vezina, C. 1984. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *The Journal of antibiotics* 37(10): 1231-1237.
- Eshleman, J.S., Carlson, B.L., Mladek, A.C., Kastner, B.D., Shide, K.L., and Sarkaria, J.N. 2002. Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 xenografts to fractionated radiation therapy. *Cancer research* 62(24): 7291-7297.
- Faivre, S., Kroemer, G., and Raymond, E. 2006. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nature reviews* 5(8): 671-688.
- Ferguson, S.D., Foster, K., and Yamini, B. 2007. Convection-enhanced delivery for treatment of brain tumors. *Expert Rev Anticancer Ther* 7(12 Suppl): S79-85.
- Ferlay, J., Parkin, D.M., and Steliarova-Foucher, E. 2010. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 46(4): 765-781.
- Ferrari, S. and Thomas, G. 1994. S6 phosphorylation and the p70s6k/p85s6k. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 29(6): 385-413.
- Feun, L. and Savaraj, N. 2008. Topoisomerase I inhibitors for the treatment of brain tumors. *Expert Rev Anticancer Ther* 8(5): 707-716.
- Fingar, D.C. and Blenis, J. 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23(18): 3151-3171.
- Fischer, J., Carvalho, P.C., Fonseca, C.O., Liao, L., Degrove, W.M., Carvalho, M.D., Yates, J.R., and Domont, G. 2010. A chemo-resistant protein expression pattern of glioblastoma cells (A172) to perillyl alcohol. *J Proteome Res*.
- Friedman, H.S., Petros, W.P., Friedman, A.H., Schaaf, L.J., Kerby, T., Lawyer, J., Parry, M., Houghton, P.J., Lovell, S., Rasheed, K., Cloughsey, T., Stewart, E.S., Colvin, O.M., Provenzale, J.M., McLendon, R.E., Bigner, D.D., Cokgor, I., Haglund, M., Rich, J., Ashley, D., Malczyn, J., Elfring, G.L., and Miller, L.L. 1999. Irinotecan therapy in adults with recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol* 17(5): 1516-1525.
- Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., Yung, W.K., Paleologos, N., Nicholas, M.K., Jensen, R., Vredenburgh, J., Huang, J., Zheng, M., and Cloughesy, T. 2009. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 27(28): 4733-4740.
- Gabathuler, R. 2010. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol Dis* 37(1): 48-57.

- Galanis, E., Buckner, J.C., Maurer, M.J., Kreisberg, J.I., Ballman, K., Boni, J., Peralba, J.M., Jenkins, R.B., Dakhil, S.R., Morton, R.F., Jaeckle, K.A., Scheithauer, B.W., Dancey, J., Hidalgo, M., and Walsh, D.J. 2005. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* 23(23): 5294-5304.
- Georger, B., Kerr, K., Tang, C.B., Fung, K.M., Powell, B., Sutton, L.N., Phillips, P.C., and Janss, A.J. 2001. Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy. *Cancer research* 61(4): 1527-1532.
- Gilbert, M.R., Supko, J.G., Batchelor, T., Lesser, G., Fisher, J.D., Piantadosi, S., and Grossman, S. 2003. Phase I clinical and pharmacokinetic study of irinotecan in adults with recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 9(8): 2940-2949.
- Goldberg, L., Ocherashvili, A., Daniels, D., Last, D., Cohen, Z.R., Tamar, G., Kloog, Y., and Mardor, Y. 2008. Salirasib (farnesyl thiosalicylic acid) for brain tumor treatment: a convection-enhanced drug delivery study in rats. *Molecular cancer therapeutics* 7(11): 3609-3616.
- Goudar, R.K., Shi, Q., Hjelmeland, M.D., Keir, S.T., McLendon, R.E., Wikstrand, C.J., Reese, E.D., Conrad, C.A., Traxler, P., Lane, H.A., Reardon, D.A., Cavenee, W.K., Wang, X.F., Bigner, D.D., Friedman, H.S., and Rich, J.N. 2005. Combination therapy of inhibitors of epidermal growth factor receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (AEE788) and the mammalian target of rapamycin (RAD001) offers improved glioblastoma tumor growth inhibition. *Molecular cancer therapeutics* 4(1): 101-112.
- Grahn, A.Y., Bankiewicz, K.S., Dugich-Djordjevic, M., Bringas, J.R., Hadaczek, P., Johnson, G.A., Eastman, S., and Luz, M. 2009. Non-PEGylated liposomes for convection-enhanced delivery of topotecan and gadodiamide in malignant glioma: initial experience. *Journal of neuro-oncology* 95(2): 185-197.
- Groothuis, D.R. 2000. The blood-brain and blood-tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery. *Neuro-oncology* 2(1): 45-59.
- Grouzmann, E., Meyer, C., Burki, E., and Brunner, H. 2001. Neuropeptide YY2 receptor signalling mechanisms in the human glioblastoma cell line LN319. *Peptides* 22(3): 379-386.
- Gruber, M.L. and Buster, W.P. 2004. Temozolomide in combination with irinotecan for treatment of recurrent malignant glioma. *Am J Clin Oncol* 27(1): 33-38.
- Guertin, D.A. and Sabatini, D.M. 2007. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12(1): 9-22.
- Gupta, P.B., Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. 2009. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* 15(9): 1010-1012.
- Gupta, T. and Sarin, R. 2002. Poor-prognosis high-grade gliomas: evolving an evidence-based standard of care. *Lancet Oncol* 3(9): 557-564.
- Hambardzumyan, D., Becher, O.J., and Holland, E.C. 2008a. Cancer stem cells and survival pathways. *Cell Cycle* 7(10): 1371-1378.
- Hambardzumyan, D., Becher, O.J., Rosenblum, M.K., Pandolfi, P.P., Manova-Todorova, K., and Holland, E.C. 2008b. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes & development* 22(4): 436-448.
- Hare, C.B., Elion, G.B., Houghton, P.J., Houghton, J.A., Keir, S., Marcelli, S.L., Bigner, D.D., and Friedman, H.S. 1997. Therapeutic efficacy of the topoisomerase I inhibitor 7-ethyl-10-(4-[1-piperidino]-1-piperidino)-carbonyloxy-camptothecin against pediatric and adult central nervous system tumor xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol* 39(3): 187-191.
- Hartford, C.M. and Ratain, M.J. 2007. Rapamycin: something old, something new, sometimes borrowed and now renewed. *Clin Pharmacol Ther* 82(4): 381-388.
- Heimberger, A.B., Wang, E., McGary, E.C., Hess, K.R., Henry, V.K., Shono, T., Cohen, Z., Gumin, J., Sawaya, R., Conrad, C.A., and Lang, F.F. 2005. Mechanisms of action of rapamycin in gliomas. *Neuro-oncology* 7(1): 1-11.
- Hentschel, S.J.L., F. F. 2005. Current Surgical Management of Glioblastoma. in *Glioblastoma Multiforme* (ed. J.D. Market, V.; Rosenberg, S. A.; Hellman, S.).

- Holland, E.C. 2000. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12): 6242-6244.
- Holm, C., Covey, J.M., Kerrigan, D., and Pommier, Y. 1989. Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells. *Cancer research* 49(22): 6365-6368.
- Hosoi, H., Dilling, M.B., Liu, L.N., Danks, M.K., Shikata, T., Sekulic, A., Abraham, R.T., Lawrence, J.C., Jr., and Houghton, P.J. 1998. Studies on the mechanism of resistance to rapamycin in human cancer cells. *Mol Pharmacol* 54(5): 815-824.
- Houchens, D.P., Ovejera, A.A., Riblet, S.M., and Slagel, D.E. 1983. Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19(6): 799-805.
- Houghton, P.J. 2010. Everolimus. *Clin Cancer Res* 16(5): 1368-1372.
- Huynh, G.H., Deen, D.F., and Szoka, F.C., Jr. 2006. Barriers to carrier mediated drug and gene delivery to brain tumors. *J Control Release* 110(2): 236-259.
- Kikuchi, T., Saito, R., Sugiyama, S., Yamashita, Y., Kumabe, T., Krauze, M., Bankiewicz, K., and Tominaga, T. 2008. Convection-enhanced delivery of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin: characterization and efficacy in rat intracranial glioma models. *J Neurosurg* 109(5): 867-873.
- Koenig, M.K., Butler, I.J., and Northrup, H. 2008. Regression of subependymal giant cell astrocytoma with rapamycin in tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 23(10): 1238-1239.
- Krauze, M.T., Forsayeth, J., Park, J.W., and Bankiewicz, K.S. 2006. Real-time imaging and quantification of brain delivery of liposomes. *Pharm Res* 23(11): 2493-2504.
- Krauze, M.T., Noble, C.O., Kawaguchi, T., Drummond, D., Kirpotin, D.B., Yamashita, Y., Kullberg, E., Forsayeth, J., Park, J.W., and Bankiewicz, K.S. 2007. Convection-enhanced delivery of nanoliposomal CPT-11 (irinotecan) and PEGylated liposomal doxorubicin (Doxil) in rodent intracranial brain tumor xenografts. *Neuro-oncology* 9(4): 393-403.
- Krauze, M.T., Saito, R., Noble, C., Tamas, M., Bringas, J., Park, J.W., Berger, M.S., and Bankiewicz, K. 2005. Reflux-free cannula for convection-enhanced high-speed delivery of therapeutic agents. *J Neurosurg* 103(5): 923-929.
- Kreisl, T.N., Kim, L., Moore, K., Duic, P., Royce, C., Stroud, I., Garren, N., Mackey, M., Butman, J.A., Camphausen, K., Park, J., Albert, P.S., and Fine, H.A. 2009a. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 27(5): 740-745.
- Kreisl, T.N., Lassman, A.B., Mischel, P.S., Rosen, N., Scher, H.I., Teruya-Feldstein, J., Shaffer, D., Lis, E., and Abrey, L.E. 2009b. A pilot study of everolimus and gefitinib in the treatment of recurrent glioblastoma (GBM). *Journal of neuro-oncology* 92(1): 99-105.
- Kuhn, J.G., Chang, S.M., Wen, P.Y., Cloughesy, T.F., Greenberg, H., Schiff, D., Conrad, C., Fink, K.L., Robins, H.I., Mehta, M., DeAngelis, L., Raizer, J., Hess, K., Lamborn, K.R., Dancey, J., and Prados, M.D. 2007. Pharmacokinetic and tumor distribution characteristics of temsirolimus in patients with recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 13(24): 7401-7406.
- Lam, C., Bouffet, E., Tabori, U., Mabbott, D., Taylor, M., and Bartels, U. 2010. Rapamycin (sirolimus) in tuberous sclerosis associated pediatric central nervous system tumors. *Pediatr Blood Cancer* 54(3): 476-479.
- Laplante, M. and Sabatini, D.M. 2009a. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol* 19(22): R1046-1052.
- 2009b. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 122(Pt 20): 3589-3594.
- Laquintana, V., Trapani, A., Denora, N., Wang, F., Gallo, J.M., and Trapani, G. 2009. New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. *Expert Opin Drug Deliv* 6(10): 1017-1032.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J.K., and Fine, H.A. 2006. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9(5): 391-403.

- Lin, H., Zhang, X., Cheng, G., Tang, H.F., Zhang, W., Zhen, H.N., Cheng, J.X., Liu, B.L., Cao, W.D., Dong, W.P., and Wang, P. 2008. Apoptosis induced by ardisin through BAD dephosphorylation and cleavage in human glioblastoma U251MG cells. *Apoptosis* 13(2): 247-257.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., and Zhao, J.J. 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews* 8(8): 627-644.
- Loghin, M.E., Prados, M.D., Wen, P., Junck, L., Lieberman, F., Fine, H., Fink, K.L., Metha, M., Kuhn, J., Lamborn, K., Chang, S.M., Cloughesy, T., DeAngelis, L.M., Robins, I.H., Aldape, K.D., and Yung, W.K. 2007. Phase I study of temozolomide and irinotecan for recurrent malignant gliomas in patients receiving enzyme-inducing antiepileptic drugs: a north american brain tumor consortium study. *Clin Cancer Res* 13(23): 7133-7138.
- Magrassi, L., Adorni, L., Montorfano, G., Rapelli, S., Butti, G., Berra, B., and Milanesi, G. 1998. Vitamin D metabolites activate the sphingomyelin pathway and induce death of glioblastoma cells. *Acta Neurochir (Wien)* 140(7): 707-713; discussion 713-704.
- Mairs, R.J., Wideman, C.L., Angerson, W.J., Whateley, T.L., Reza, M.S., Reeves, J.R., Robertson, L.M., Neshasteh-Riz, A., Rampling, R., Owens, J., Allan, D., and Graham, D.I. 2000. Comparison of different methods of intracerebral administration of radioiododeoxyuridine for glioma therapy using a rat model. *Br J Cancer* 82(1): 74-80.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1(3): 222-231.
- Mamot, C., Nguyen, J.B., Pourdehnad, M., Hadaczek, P., Saito, R., Bringas, J.R., Drummond, D.C., Hong, K., Kirpotin, D.B., McKnight, T., Berger, M.S., Park, J.W., and Bankiewicz, K.S. 2004. Extensive distribution of liposomes in rodent brains and brain tumors following convection-enhanced delivery. *Journal of neuro-oncology* 68(1): 1-9.
- Martel, R.R., Klicius, J., and Galet, S. 1977. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol* 55(1): 48-51.
- Messina, M.P., Raukty, A., Lee, L., and Dabora, S.L. 2007. Tuberous sclerosis preclinical studies: timing of treatment, combination of a rapamycin analog (CCI-779) and interferon-gamma, and comparison of rapamycin to CCI-779. *BMC pharmacology* 7: 14.
- Mitchell, P., Ellison, D.W., and Mendelow, A.D. 2005. Surgery for malignant gliomas: mechanistic reasoning and slippery statistics. *Lancet neurology* 4(7): 413-422.
- Muthukkumar, S., Ramesh, T.M., and Bondada, S. 1995. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug, causes programmed cell death in B lymphoma cells. *Transplantation* 60(3): 264-270.
- Noble, C.O., Krauze, M.T., Drummond, D.C., Yamashita, Y., Saito, R., Berger, M.S., Kirpotin, D.B., Bankiewicz, K.S., and Park, J.W. 2006. Novel nanoliposomal CPT-11 infused by convection-enhanced delivery in intracranial tumors: pharmacology and efficacy. *Cancer research* 66(5): 2801-2806.
- Noda, S.E., El-Jawahri, A., Patel, D., Lautenschlaeger, T., Siedow, M., and Chakravarti, A. 2009. Molecular advances of brain tumors in radiation oncology. *Semin Radiat Oncol* 19(3): 171-178.
- Ogden, A.T., Waziri, A.E., Lochhead, R.A., Fusco, D., Lopez, K., Ellis, J.A., Kang, J., Assanah, M., McKhann, G.M., Sisti, M.B., McCormick, P.C., Canoll, P., and Bruce, J.N. 2008. Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* 62(2): 505-514; discussion 514-505.
- Ohgaki, H. 2005. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* 25(1): 1-7.
- Ohgaki, H. and Kleihues, P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170(5): 1445-1453.
2009. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 100(12): 2235-2241.
- Ommaya, A.K. 1984. Implantable devices for chronic access and drug delivery to the central nervous system. *Cancer Drug Deliv* 1(2): 169-179.

- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Diaz, L.A., Jr., Hartigan, J., Smith, D.R., Strausberg, R.L., Marie, S.K., Shinjo, S.M., Yan, H., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., and Kinzler, K.W. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* (New York, NY 321(5897): 1807-1812.
- Paxinos, G. and Watson, C. 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier.
- Peralba, J.M., DeGraffenried, L., Friedrichs, W., Fulcher, L., Grunwald, V., Weiss, G., and Hidalgo, M. 2003. Pharmacodynamic Evaluation of CCI-779, an Inhibitor of mTOR, in Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 9(8): 2887-2892.
- Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., Williams, P.M., Modrusan, Z., Feuerstein, B.G., and Aldape, K. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9(3): 157-173.
- Prados, M.D., Chang, S.M., Butowski, N., DeBoer, R., Parvataneni, R., Carliner, H., Kabuubi, P., Ayers-Ringler, J., Rabbitt, J., Page, M., Fedoroff, A., Sneed, P.K., Berger, M.S., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Vandenberg, S., James, C.D., Lamborn, K.R., Stokoe, D., and Haas-Kogan, D.A. 2009. Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. *J Clin Oncol* 27(4): 579-584.
- Prados, M.D., Lamborn, K., Yung, W.K., Jaeckle, K., Robins, H.I., Mehta, M., Fine, H.A., Wen, P.Y., Cloughesy, T., Chang, S., Nicholas, M.K., Schiff, D., Greenberg, H., Junck, L., Fink, K., Hess, K., and Kuhn, J. 2006. A phase 2 trial of irinotecan (CPT-11) in patients with recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. *Neuro-oncology* 8(2): 189-193.
- Prados, M.D., Yung, W.K., Jaeckle, K.A., Robins, H.I., Mehta, M.P., Fine, H.A., Wen, P.Y., Cloughesy, T.F., Chang, S.M., Nicholas, M.K., Schiff, D., Greenberg, H.S., Junck, L., Fink, K.L., Hess, K.R., and Kuhn, J. 2004. Phase 1 trial of irinotecan (CPT-11) in patients with recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. *Neuro-oncology* 6(1): 44-54.
- Prados, M.D., Yung, W.K., Wen, P.Y., Junck, L., Cloughesy, T., Fink, K., Chang, S., Robins, H.I., Dancey, J., and Kuhn, J. 2008. Phase-1 trial of gefitinib and temozolomide in patients with malignant glioma: a North American brain tumor consortium study. *Cancer Chemother Pharmacol* 61(6): 1059-1067.
- Provenzale, J.M., Mukundan, S., and Dewhirst, M. 2005. The role of blood-brain barrier permeability in brain tumor imaging and therapeutics. *AJR Am J Roentgenol* 185(3): 763-767.
- Punt, C.J., Boni, J., Brunsch, U., Peters, M., and Thielert, C. 2003. Phase I and pharmacokinetic study of CCI-779, a novel cytostatic cell-cycle inhibitor, in combination with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol* 14(6): 931-937.
- Quinn, J.A., Jiang, S.X., Reardon, D.A., Desjardins, A., Vredenburgh, J.J., Friedman, A.H., Sampson, J.H., McLendon, R.E., Herndon, J.E., 2nd, and Friedman, H.S. 2009. Phase II trial of temozolomide (TMZ) plus irinotecan (CPT-11) in adults with newly diagnosed glioblastoma multiforme before radiotherapy. *Journal of neuro-oncology* 95(3): 393-400.
- Raymond, E., Alexandre, J., Faivre, S., Vera, K., Maternan, E., Boni, J., Leister, C., Korth-Bradley, J., Hanauske, A., and Armand, J.P. 2004. Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 22(12): 2336-2347.
- Raymond, E., Fabbro, M., Boige, V., Rixe, O., Frenay, M., Vassal, G., Faivre, S., Sicard, E., Germa, C., Rodier, J.M., Vernillet, L., and Armand, J.P. 2003. Multicentre phase II study and pharmacokinetic analysis of irinotecan in chemotherapy-naïve patients with glioblastoma. *Ann Oncol* 14(4): 603-614.

- Reardon, D.A., Desjardins, A., Vredenburgh, J.J., Gururangan, S., Friedman, A.H., Herndon, J.E., 2nd, Marcello, J., Norfleet, J.A., McLendon, R.E., Sampson, J.H., and Friedman, H.S. 2010. Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *Journal of neuro-oncology* 96(2): 219-230.
- Reardon, D.A., Quinn, J.A., Rich, J.N., Desjardins, A., Vredenburgh, J., Gururangan, S., Sathornsumetee, S., Badruddoja, M., McLendon, R., Provenzale, J., Herndon, J.E., 2nd, Dowell, J.M., Burkart, J.L., Newton, H.B., Friedman, A.H., and Friedman, H.S. 2005. Phase I trial of irinotecan plus temozolomide in adults with recurrent malignant glioma. *Cancer* 104(7): 1478-1486.
- Reardon, D.A., Quinn, J.A., Vredenburgh, J.J., Gururangan, S., Friedman, A.H., Desjardins, A., Sathornsumetee, S., Herndon, J.E., 2nd, Dowell, J.M., McLendon, R.E., Provenzale, J.M., Sampson, J.H., Smith, R.P., Swaisland, A.J., Ochs, J.S., Lyons, P., Tourt-Uhlig, S., Bigner, D.D., Friedman, H.S., and Rich, J.N. 2006. Phase 1 trial of gefitinib plus sirolimus in adults with recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 12(3 Pt 1): 860-868.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414(6859): 105-111.
- Saito, R., Bringas, J.R., McKnight, T.R., Wendland, M.F., Mamot, C., Drummond, D.C., Kirpotin, D.B., Park, J.W., Berger, M.S., and Bankiewicz, K.S. 2004. Distribution of liposomes into brain and rat brain tumor models by convection-enhanced delivery monitored with magnetic resonance imaging. *Cancer research* 64(7): 2572-2579.
- Saito, R., Bringas, J.R., Panner, A., Tamas, M., Pieper, R.O., Berger, M.S., and Bankiewicz, K.S. 2004. Convection-enhanced delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand with systemic administration of temozolomide prolongs survival in an intracranial glioblastoma xenograft model. *Cancer research* 64(19): 6858-6862.
- Saito, R., Krauze, M.T., Noble, C.O., Drummond, D.C., Kirpotin, D.B., Berger, M.S., Park, J.W., and Bankiewicz, K. S. . 2006. Convection-enhanced delivery of LS-TPT enables an effective continuous low-dose chemotherapy against malignant glioma xenograft model. *NeuroOncology*.
- Santisteban, M., Buckner, J.C., Reid, J.M., Wu, W., Scheithauer, B.W., Ames, M.M., Felten, S.J., Nikcevic, D.A., Wiesenfeld, M., Jaeckle, K.A., and Galanis, E. 2009. Phase II trial of two different irinotecan schedules with pharmacokinetic analysis in patients with recurrent glioma: North Central Cancer Treatment Group results. *Journal of neuro-oncology* 92(2): 165-175.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14(14): 1296-1302.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, NY)* 307(5712): 1098-1101.
- Sathornsumetee, S., Reardon, D.A., Desjardins, A., Quinn, J.A., Vredenburgh, J.J., and Rich, J.N. 2007. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer* 110(1): 13-24.
- Schulenburg, A., Ulrich-Pur, H., Thurnher, D., Erovic, B., Florian, S., Sperr, W.R., Kalhs, P., Marian, B., Wrba, F., Zielinski, C.C., and Valent, P. 2006. Neoplastic stem cells: a novel therapeutic target in clinical oncology. *Cancer* 107(10): 2512-2520.
- Sehgal, S.N., Baker, H., and Vezina, C. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of antibiotics* 28(10): 727-732.
- Shoichet, M.S. and Winn, S.R. 2000. Cell delivery to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev* 42(1-2): 81-102.
- Singh, K., Sun, S., and Vezina, C. 1979. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. IV. Mechanism of action. *The Journal of antibiotics* 32(6): 630-645.

- Singh, S., Dwarakanath, B.S., and Lazar Mathew, T. 2005. Role of topoisomerases in cytotoxicity induced by DNA ligand Hoechst-33342 and UV-C in a glioma cell line. *Indian J Exp Biol* 43(4): 313-323.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research* 63(18): 5821-5828.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432(7015): 396-401.
- Slichenmyer, W.J., Rowinsky, E.K., Grochow, L.B., Kaufmann, S.H., and Donehower, R.C. 1994. Camptothecin analogues: studies from the Johns Hopkins Oncology Center. *Cancer Chemother Pharmacol* 34 Suppl: S53-57.
- Stahl, S.M. 1988. Applications of new drug delivery technologies to Parkinson's disease and dopaminergic agents. *J Neural Transm Suppl* 27: 123-132.
- Surawicz, B. 1998. U wave: facts, hypotheses, misconceptions, and misnomers. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 9(10): 1117-1128.
- Tronstad, K.J., Berge, K., Dyroy, E., Madsen, L., and Berge, R.K. 2001. Growth reduction in glioma cells after treatment with tetradecylthioacetic acid: changes in fatty acid metabolism and oxidative status. *Biochem Pharmacol* 61(6): 639-649.
- Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.K., Wen, P.Y., and Olson, J.J. 2010. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60(3): 166-193.
- Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., and Hayes, D.N. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17(1): 98-110.
- Vivanco, I. and Sawyers, C.L. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2(7): 489-501.
- Vredenburgh, J.J., Desjardins, A., Herndon, J.E., 2nd, Dowell, J.M., Reardon, D.A., Quinn, J.A., Rich, J.N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Wagner, M., Bigner, D.D., Friedman, A.H., and Friedman, H.S. 2007a. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 13(4): 1253-1259.
- Vredenburgh, J.J., Desjardins, A., Herndon, J.E., 2nd, Marcello, J., Reardon, D.A., Quinn, J.A., Rich, J.N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Sampson, J., Wagner, M., Bailey, L., Bigner, D.D., Friedman, A.H., and Friedman, H.S. 2007b. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 25(30): 4722-4729.
- Walker, M.D., Alexander, E., Jr., Hunt, W.E., MacCarty, C.S., Mahaley, M.S., Jr., Mealey, J., Jr., Norrell, H.A., Owens, G., Ransohoff, J., Wilson, C.B., Gehan, E.A., and Strike, T.A. 1978. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* 49(3): 333-343.
- Wen, P.Y. and Kesari, S. 2008. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359(5): 492-507.
- Widmer, M., Hanemann, C.O., and Zajicek, J. 2008. High concentrations of cannabinoids activate apoptosis in human U373MG glioma cells. *J Neurosci Res* 86(14): 3212-3220.
- Wullschlegel, S., Loewith, R., and Hall, M.N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124(3): 471-484.
- Xu, T., Chen, J., Lu, Y., and Wolff, J.E. 2010. Effects of bevacizumab plus irinotecan on response and survival in patients with recurrent malignant glioma: a systematic review and survival-gain analysis. *BMC Cancer* 10(1): 252.

- Yamashita, Y., Krauze, M.T., Kawaguchi, T., Noble, C.O., Drummond, D.C., Park, J.W., and Bankiewicz, K.S. 2007. Convection-enhanced delivery of a topoisomerase I inhibitor (nanoliposomal topotecan) and a topoisomerase II inhibitor (pegylated liposomal doxorubicin) in intracranial brain tumor xenografts. *Neuro-oncology* 9(1): 20-28.
- Yamashita, Y., Saito, R., Krauze, M.T., T., K., Noble, C.O., Drummond, D.C., Kirpotin, D.B., Park, J.W., Berger, M.S., and Bankiewicz, K.S. 2006. Convection-enhanced delivery of liposomal doxorubicin in intracranial brain tumor xenografts. *Target Oncol* 1: 79-85.
- Yang, W., Huo, T., Barth, R.F., Gupta, N., Weldon, M., Grecula, J.C., Ross, B.D., Hoff, B.A., Chou, T.C., Rousseau, J., and Elleaume, H. 2010. Convection enhanced delivery of carboplatin in combination with radiotherapy for the treatment of brain tumors. *Journal of neuro-oncology*.
- Yin, D., Forsayeth, J., and Bankiewicz, K.S. 2010. Optimized cannula design and placement for convection-enhanced delivery in rat striatum. *J Neurosci Methods* 187(1): 46-51.
- Yokosawa, M., Sonoda, Y., Sugiyama, S., Saito, R., Yamashita, Y., Nishihara, M., Satoh, T., Kumabe, T., Yokoyama, M., and Tominaga, T. 2010. Convection-enhanced delivery of a synthetic retinoid Am80, loaded into polymeric micelles, prolongs the survival of rats bearing intracranial glioblastoma xenografts. *Tohoku J Exp Med* 221(4): 257-264.
- Yu, S.C., Yi, L., Zhou, Z.H., Yao, X.H., Ping, Y.F., and Bian, X.W. 2007. [Isolation and identification of tumor stem-like cells from human glioma cell line U87 after treatment of vincristine]. *Ai Zheng* 26(12): 1388-1391.
- Zaidi, H.A., Kosztowski, T., DiMeco, F., and Quinones-Hinojosa, A. 2009. Origins and clinical implications of the brain tumor stem cell hypothesis. *Journal of neuro-oncology* 93(1): 49-60.

